



*Universidad de Buenos Aires -UBA-  
Facultad de Farmacia y Bioquímica*



**Departamento de Biología Celular, Área de Investigación  
Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo”**

# **“Moléculas clave en la progresión del Carcinoma Celular Renal de células claras- Evaluación estadística de su posible uso como biomarcadores clínicos”**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el  
área de Ciencias de la salud

**Lic. María Elena Knott**

Directora de tesis: **Dra. Lydia Inés Puricelli**

Co-directora de tesis: **Dra. Myriam Nuñez**

**Buenos Aires, Diciembre 2015**

“Vos tenés que estudiar aquello que te permita trabajar en lo que te haga feliz, porque sólo vacacionamos dos semanas al año, durante el resto... ¡hay que trabajar!”

**Ester Castronovo**

Esta frase me la dijo mi madre en algún momento, mientras cursaba mi último año del secundario, resignada a que, finalmente, estudiaría biología, carrera que ella conocía bien, pues también fue bióloga egresada de la FCEyN. Elijo esta frase ya que me acompañó durante todos los días de mi doctorado. Es también un reconocimiento a ella y a mi padre, Luis Alberto Knott, quienes poco tiempo pudieron recorrer a mi lado, pero que sin duda me marcaron para siempre. A pesar de los altibajos propios de una vida dedicada a la ciencia, puedo decir que cumplí con el deseo de mi madre. Casi no hubo días en los que no haya pensado, mientras viajaba en el colectivo que me llevaba hacia el Roffo, “mamá, papá soy afortunada de trabajar en lo que me hace feliz, ¡¡GRACIAS por su esfuerzo!!”. Este trabajo esta dedicado a su memoria.

## AGRADECIMIENTOS

**Lydia:** Por la gran oportunidad que me diste, no solo de realizar mi tesis doctoral, sino que también de desarrollarme y crecer como científica. Gracias por la infinita paciencia, para explicarme todo lo que aprendí. Por comprender mis tiempos y mis defectos, en particular el de entregar todo a último momento. Gracias por siempre encontrar un espacio para lo personal, por escucharme y compartir mis angustias y mis alegrías. Para mí fue un placer ser tu última becaria y acompañarte en el cierre de esta gran etapa. Gracias a vos por guiarme en mis inicios y por dejarme una huella que me acompañará el resto de mi carrera.

**Myriam:** Por todo lo que me enseñaste de estadística, que sin duda, tiene un gran valor para mi futuro. Gracias por tu calidez y por tu comprensión cada vez que me ponía nerviosa con los trámites. Gracias por tu tiempo y por las charlas tranquilizadoras.

**Maru:** Por confiar en mí para realizar este proyecto y los que se vienen. Por dedicarle, prácticamente todo tu tiempo, a terminar con este capítulo. Por todas las veces que me levantaste el ánimo cuando me sentía sobrepasada y por preocuparte, siempre, de mi bienestar y comodidad en el CIBION.

**Raúl:** Por brindarme una oportunidad enorme de aprendizaje, por tu calidez y la de todo tu grupo de investigación. Gracias por abrirme las puertas y compartir conmigo su trabajo y sus proyectos. No me alcanzan las palabras de agradecimiento para Carlos, Claudia y Bárbara quienes dedicaron gran parte de su tiempo en ayudarme con los experimentos.

**Elisa:** Por todo lo que me enseñaste que, sin duda, me acompañará durante toda mi carrera científica.

**Stella:** Por tu compañía y tu preocupación cada vez que tuve algún problema en el hospital. Por tu gran ayuda con las dudas de la parte médica e histológica.

**A mis amigos Becarios:** Imposible poner en palabras lo agradecida que estoy de haberlos conocido y de que hayamos sido compañeros de trabajo. Gracias por TODO lo que aprendí de ustedes, no sólo de experimentos y biología molecular sino que también de la vida, del trabajo en grupo y del compañerismo. Gracias por las infinitas charlas, las salidas, las picadas. Gracias por escucharme y levantarme siempre que lo necesité. Que no se pierda lo que construimos. Que no se pierda la magia de becariato. Que siempre exista un becariato que nos convoque a reencontrarnos.

Gracias también al resto de los **investigadores y todo el personal de apoyo, técnicos y secretarías del área de investigación, del biobanco y de UTG**. Sin el trabajo y apoyo de ustedes, sería mucho más difícil el desempeño de todos los que trabajamos en el área. En especial quiero agradecer a **Ali y Rocío** que me acompañaron muy de cerca y siempre se preocuparon de que no me falte nada.

A los médicos del **Servicio de Urología del IOAHR** por integrar el equipo de trabajo y colaborar con ideas y proyectos. Gracias por el apoyo para el reclutamiento de los pacientes.

**Carla:** Por tu increíble paciencia para ver los cortes conmigo. Por hacerte tiempo aún cuando no lo tenías. Por las infinitas charlas mientras mirábamos los cortes que, sin duda, hicieron muy ameno el tiempo frente al microscopio.

**Meli y Lina:** Por su trabajo excelente y meticuloso.

A todo el personal de los **servicios de Oncología y Urología del Hospital Italiano**. En particular, a los **doctores Pallotta y Lastiri** quienes me dieron un espacio y un grupo de trabajo, pero también a los médicos y secretarios que siempre me acompañaron y asistieron. También quiero agradecer al **Dr. Gueglio** quien se preocupó de brindarme su tiempo cada vez que lo necesité.

También quiero agradecer a las personas que me ayudaron desde afuera del ámbito de trabajo, a quienes me acompañan todos los días. Sobre todo, gracias por aguantarme estos últimos tres meses. La escritura fue ardua y no sólo estuve un poco monotemática en las conversaciones sino que también estuve bastante ausente, despistada y olvidadiza. Gracias por saber comprender, por escucharme y apoyarme incondicionalmente. ¡Gran parte de este trabajo se los debo a ustedes!

**Juanma:** Imposible plasmar en esta hoja lo que significas en mi vida. Gracias por “nosotros”, por nuestra vida, nuestros proyectos. Gracias por tu enorme, infinita, gigantesca paciencia para aguantar desde adentro esta elección de vida, mi elección de dedicarme a la ciencia. No puedo explicarte lo que significa para mí que me apoyes, que me hayas esperado con una sonrisa cada vez que llegué tarde a casa porque se me atrasó un experimento. Ni hablar de tu aguante de estos tres meses de escritura. Gracias por tu amor y paciencia para bajarme los humos cada vez que me agarró la loca, que no fueron pocas, lo sé! Gracias sobre todo por toda la ayuda que me diste con la herramienta de trabajo más importante, la pc! Por descargarme e instalarme los programas que necesitaba, por la asistencia técnica cada vez que algo no funcionaba y por solucionarme cada pequeño problema, que para mí eran un mundo! Sé lo difícil que es para vos, dedicarle tiempo a esas cosas, siendo que trabajas todo el día con lo mismo. GRACIAS!

Un gracias gigante a **mi familia**, que siempre está presente y siempre me ha acompañado y apoyado. Gracias a mis tíos, a mis primos, algunos incluso casi son hermanos. En particular, gracias a mis **tías María e Irene**. Por su rol de madres, por estar pendientes de cada detalle, por escucharme y mimarme. Por cuidar que nada me falte. Gracias tía María por sacarme adelante. Sin duda, este logro que estoy conquistando hubiese sido imposible si no hubieses estado cuando más te necesité. Gracias, también a mi **abuela Resede**, mi **tía Cata** y mi **prima Gise**, grandes mujeres de esta familia que son un ejemplo en mi vida, y a mi **tía Ela** a quien le hubiera parecido maravilloso mi trabajo.

No puedo dejar de agradecer a mi **familia política** y a mi **familia cipolleña** que están siempre presentes, que nos apoyan incondicionalmente. Gracias por interesarse en mi trabajo, por preguntarme aún cuando es aburrido!

Por último, **mis amigos!, los de la facu, los cipolleños, los políticos** (los de Juanma). Gracias por la compañía por el apoyo, por estar siempre, en las buenas y en las malas. Que sería de mi vida sin mis amigos! Sin duda, una más triste y aburrida. Gracias por ser parte de ella!. En particular, gracias **Vero!!** Gracias por tu gran ayuda con el TP de EDM y por cada charla que tuvimos sobre análisis de datos. Me genera mucha alegría que compartamos la metodología de trabajo! Gracias también a **Nico**, por explicarme regresión logística un sábado de noche con pizza y birra de por medio. Claramente, te llevas el premio a la paciencia!

**¡¡A TODOS, INFINITAS GRACIAS!!**



## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
CÁNCER.....	3
CARCINOMA CELULAR RENAL.....	9
Diagnóstico clínico de CCR.....	9
Biología molecular de los CCR.....	10
a. CCR de células claras (CCRcc).....	10
a.1 CCRcc: desregulación de vías metabólicas.....	12
a.1 CCRcc: Aumento de la actividad en vías angiogénicas.....	15
a.3 CCRcc: otras alteraciones moleculares.....	16
b. El CCR papilar y la vía de señalización que regula la Transición Epitelio Mesenquimática (TEM).....	16
c. Otros tipos de CCR y sus alteraciones moleculares.....	17
MARCADORES TUMORALES.....	18
Parámetros utilizados para definir la utilidad de un marcador.....	18
Moléculas a estudiar en la búsqueda de biomarcadores.....	19
Clasificación de los biomarcadores según su utilidad clínica.....	19
Biobancos de muestras biológicas humanas.....	21
Estudio de biomarcadores a gran escala.....	22
BIOMARCADORES CON POSIBLE UTILIDAD CLÍNICA EN CCR.....	28
a. Marcadores de diagnóstico.....	28
b. Marcadores de pronóstico.....	30
c. Marcadores predictivos y de respuesta a los tratamientos instaurados.....	31
d. Marcadores metabolómicos.....	33
MOLÉCULAS QUE SE ESTUDIARON EN ESTE TRABAJO PARA EVALUAR SU POTENCIAL USO COMO BIOMARCADOR EN CCRcc.....	34
TRANSPORTADOR DE GLUCOSA DE TIPO 1 (GLUT1).....	34
ANHIDRASA CARBÓNICA IX (CAIX).....	35
FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO 21 (FGF21).....	37
SIRTUINA 6 (SIRT6).....	38
HIPÓTESIS.....	41
OBJETIVOS.....	42
OBJETIVO GENERAL.....	42
A) OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
B) OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
ESTUDIO DE BIOMARCADORES DIAGNÓSTICOS Y PRONÓSTICOS EN PACIENTES CON CARCINOMA RENAL CCRcc.....	44
1- PACIENTES INCLUIDOS EN LOS ESTUDIOS.....	44
1A- Criterios de inclusión y exclusión de los pacientes.....	44
1B- Datos clínico-patológicos.....	44
1C- Información clínica analizada en pacientes.....	45
1C1- Pacientes con CCRcc.....	45
1C2- Pacientes con cáncer de mama.....	47
1D- Aspectos éticos.....	48
2- ESTUDIO DE MARCADORES TISULARES (CAIX y GLUT1) EN TUMORES CCRcc.....	49
2A- Población.....	49
2B- Técnica de Inmunohistoquímica (IHQ).....	49
2C- Evaluación de la expresión antigénica.....	50
3- ESTUDIO DE BIOMARCADORES EN SUERO DE PACIENTES CCRcc.....	50
3A- Muestras de suero.....	50

3B- Análisis de la expresión de CAIX, FGF21 y Leptina mediante Test ELISA.....	52
3B1- Población.....	52
3B2- Técnica ELISA.....	53
3B3-Cuantificación de otros parámetros séricos.....	54
3C- Análisis de la expresión de 43 moléculas angiogénicas mediante el uso de la técnica de microarray de proteínas (Antibody Array).....	54
3C1- Población.....	54
3C2- Técnica de Antibody Array.....	55
3D- Estudio metabolómico preliminar por Cromatografía Líquida de Ultra Performance acoplada a Espectrometría de Masas de alta resolución (UPLC-QTOF-MS).....	56
3D1- Población.....	56
3D2- Preparación de las muestras.....	56
3D3- Análisis por Cromatografía Líquida acoplado a Espectrometría de Masas (UPLC-QTOF-MS).....	57
4- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	58
ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO CELULAR EN CÉLULAS DE CARCINOMA RENAL CCRcc.....	60
Líneas celulares.....	60
Silenciamiento de SIRT6: infección con lentivirus.....	60
Plásmidos.....	60
Infección de células con lentivirus.....	61
Selección de las células infectadas.....	61
Inducción del silenciamiento de SIRT6.....	61
Ensayo de incorporación de glucosa por citometría de flujo.....	63
Análisis estadístico.....	63
RESULTADOS.....	64
EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR DE GLUCOSA (GLUT1) EN TUMORES HUMANOS DE CARCINOMA RENAL CCRcc.....	64
CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN PARCIAL.....	68
EXPRESIÓN DE LA ANHIDRASA CARBÓNICA IX EN PACIENTES CON CARCINOMA RENAL CCRcc.....	70
A- CAIX TISULAR.....	70
B-CAIX EN SUERO (CAIXs).....	74
CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN PARCIAL.....	83
EXPRESIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO 21 EN SUERO (FGF21s) DE PACIENTES CON CCRcc.....	90
CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN PARCIAL.....	108
RESÚMEN PARCIAL DE RESULTADOS.....	113
EXPRESIÓN DE 43 PROTEINAS ASOCIADAS AL PROCESO ANGIOGENICO EN PACIENTES PORTADORES DE CCRcc.....	114
CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN PARCIAL.....	118
ESTUDIO METABOLÓMICO PRELIMINAR POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ULTRA PERFORMANCE ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN (UPLC- QTOF-MS).....	121
CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN PARCIAL.....	128
ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE SIRT6 Y SU ASOCIACIÓN CON EL METABOLISMO EN CÉLULAS DE CARCINOMA RENAL CCRcc.....	130
CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN PARCIAL.....	134
DISCUSIÓN FINAL.....	137
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	139
ANEXO.....	152

## ABREVIATURAS

2-NBDG: 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxiglucosa.

ARNm: ARN mensajero.

CAIX: Anhidrasa Carbónica IX humana.

CAIXs: CAIX sérica.

CCR: Carcinoma Celular Renal.

CCRcc: Carcinoma Celular Renal de células claras.

CCRcrb: Carcinoma Celular Renal cromóforo.

CI: Consentimiento Informado.

COX: Modelo de regresión multivariado de los riesgos proporcionales.

Cr: Cromosoma.

CRF: *Case Report Form*.

CS: Control sano.

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol.

DMEM: Medio Esencial Mínimo, Modificado por Dulbecco.

E: Estadio.

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético.

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*.

EM: Espectrometría de Masa.

Es: Especificidad

ESI: *Electrospray Ionization*.

FGF21: Factor de Crecimiento Fibroblástico 21.

FGF21s: FGF21 sérico.

G: Grado nuclear o de Fuhrman, para carcinoma renal.

GLUT1: Transportador de glucosa tipo 1 humano.

HDL: Lipoproteína de alta densidad.

HEPES: Ácido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfónico.

HIF: Factor Inducible por Hipoxia.

HRP: *Horseradish Peroxidase*.

IHQ: Técnica de Inmunohistoquímica.

KO: *Knock out*.

KW: Test estadístico Kruskal-Wallis.

LDHA: Lactato Deshidrogenasa A.

LDL: Lipoproteína de baja densidad.

M: Metástasis.

*m/z*: Relación masa/carga.

MDD: Mínima Dosis Detectable.

MEM: Medio de cultivo Esencial Mínimo.

MW: Test estadístico Mann-Whitney.

oPLS-DA: *orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis*.

PBS: Buffer fosfato salino.

PCA: Análisis por Componentes Principales.

PDHK1: Piruvato Deshidrogenasa Kinasa 1.

PS: *Performance Status*.

PVDF: Difloruro de polivinilideno.

RE: Receptor de Estrógenos.

RFP: *Red Fluorescence Protein*.

ROC: Test *Receiver Operating Characteristic*.

RP: Receptor de Progesterona.

SDS-PAGE: Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con SDS.

Se: Sensibilidad

SFB: Suero Fetal Bovino.

ShARN: ARN en horquilla.

SIRT6: Sirtuina 6.

SLE: Supervivencia libre de enfermedad.

SVG: Supervivencia global.

T: Tamaño tumoral.

*t<sub>r</sub>*: tiempo de retención.

UPLC: Cromatografía Líquida de Ultra Performance.

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*.

VPN: Valor Predictivo Negativo.

VPP: Valor Predictivo Positivo.

WB: *Western blot*.

WT: *Wild type*.

## RESUMEN

Los médicos se enfrentan a grandes obstáculos en el tratamiento de pacientes con Carcinoma Celular Renal (CCR), tales como la ausencia de síntomas en etapas tempranas de la enfermedad, su alto potencial metastásico, su resistencia a la terapia convencional y la falta de biomarcadores con utilidad clínica. Estos hechos destacan la necesidad de contar con marcadores diagnósticos y pronósticos que permitan conocer cuál será la evolución del paciente.

El CCR de células claras (CCRcc) es el tipo histológico más frecuente ya que representa el 75-80% de todos los casos de CCR. La vía de señalización más comúnmente alterada en este tumor es la del Factor Inducible por Hipoxia  $\alpha$  (HIF $\alpha$ ). La mayor disponibilidad de HIF $\alpha$  en CCRcc gatilla la expresión de moléculas involucradas en la angiogénesis y en la adaptación celular a una menor disponibilidad de oxígeno, situación común en el microambiente tumoral. Además, en los últimos años, se ha aceptado que el CCRcc es una enfermedad metabólica, ya que, los genes mutados están relacionados con distintas vías metabólicas, como aquellas relacionados con el metabolismo de lípidos y colesterol.

En este trabajo de investigación se estudió el tejido tumoral y el suero de pacientes con CCRcc, para buscar biomarcadores de utilidad diagnóstica y/o pronóstica.

En primer lugar, se evaluó la expresión de la Anhidrasa Carbónica IX (CAIX), relacionada con la regulación del pH del microambiente tumoral, y del transportador de glucosa tipo 1 (GLUT1) en tejido tumoral, mediante inmunohistoquímica. Se encontró que una elevada expresión de GLUT1 en membrana se asoció con peor pronóstico en términos de supervivencia libre de enfermedad (SLE), de manera independiente de otros parámetros indicadores de pronóstico para CCR como el estadio y el grado nuclear. A su vez, una baja expresión de CAIX en la membrana de las células tumorales se asoció con la presencia de enfermedad metastásica al diagnóstico.

Por otro lado, se estudió, mediante un test Elisa, la concentración sérica de la enzima CAIXs y del Factor de Crecimiento Fibroblástico 21 (FGF21s), involucrado en el control de los niveles de glucemia y ácidos grasos circulantes. Ambas moléculas están aumentadas en los pacientes portadores de CCRcc respecto a la población control. Se obtuvo una Sensibilidad y una Especificidad del 75% y 76%, para CAIXs y del 81% y 65% para FGF21s. Se observó que, una elevada expresión de FGF21s, se asoció con menor SLE con una significancia borderline (Test de Log-Rank,  $p=0,07$ ). Sin embargo, el análisis multivariado indicó que esta asociación es independiente de los parámetros más usados en la clínica, como estadio y grado nuclear de Fuhrman.

Además, se encontró que CAIXs se asoció significativamente con el tamaño tumoral y el estadio, ya que la concentración de CAIXs aumenta conforme aumentan estos dos parámetros clínicos. Además, la elevada expresión de CAIXs se asoció con peor supervivencia global, en forma independiente del grado nuclear pero no del estadio. Por último, se estudió la correlación de CAIXs y la expresión de CAIX en membrana y citoplasma de las células tumorales en un grupo de pacientes. Se encontró una asociación directa de CAIXs con CAIX en citoplasma y una tendencia a una correlación inversa con CAIX en membrana: los tumores de los pacientes que presentaban mayor concentración de CAIXs expresan más CAIX en citoplasma y tienden a presentar menor cantidad de la enzima en la membrana plasmática.

También, mediante la técnica de microarray de proteínas se evaluó un panel de moléculas involucradas en la angiogénesis. No se obtuvieron resultados promisorios en la población estudiada probablemente debido a que se necesita un número mayor de muestras. Sin embargo, por el alto costo de la técnica se decidió no continuar con el estudio.

Finalmente, en muestras de suero de pacientes y de controles sanos, se realizó un análisis metabolómico preliminar mediante la técnica de UPLC-QTOF-MS. En una primer instancia, se logró desarrollar un método que optimiza la obtención de datos de los sueros y que será utilizado en un estudio con un mayor número de muestras. Los resultados obtenidos son promisorios, ya que se encontraron moléculas cuya concentración difiere significativamente entre los controles sanos y los pacientes, siendo todas ellas lípidos o derivados.

Por último, se evaluó la expresión y el efecto del silenciamiento de SIRT6, una enzima involucrada en la regulación de HIF1 $\alpha$  y del metabolismo celular, en células derivadas de tumores CCRcc. Si bien se observó un aumento en la incorporación de glucosa de las células silenciadas con respecto a su control no silenciado, no se observaron diferencias en los niveles de expresión de enzimas claves involucradas en la glucólisis. Estos resultados indican que el silenciamiento de SIRT6 induciría un aumento en la incorporación de glucosa a expensas de una mayor actividad de GLUT1, pero no regularía la expresión del transportador ni de otras enzimas glucolíticas.

Los conocimientos aportados en esta tesis permitirán un mayor entendimiento de las bases moleculares y metabólicas del CCRcc. Los resultados de mayor relevancia señalan a CAIXs y FGF21s como moléculas con utilidad como biomarcadores diagnóstico y pronóstico en términos de supervivencia global para CAIXs y libre de enfermedad para FGF21s. La confirmación y validación de estos resultados en otras poblaciones, tendrán un impacto positivo en la supervivencia del paciente con carcinoma renal de células claras.

## INTRODUCCIÓN

### CÁNCER

El cáncer puede definirse como una colección de enfermedades que son causadas por alteraciones en el ADN, en genes que, principalmente, controlan el crecimiento, diferenciación y muerte celular. Estas alteraciones genéticas pueden heredarse de los padres o desarrollarse durante el transcurso de la vida del individuo como resultado del daño producido al ADN por exposición ambiental a ciertas sustancias o agentes (alteración exógena) o por fallas en la reparación de errores al azar que ocurren durante su duplicación (alteración endógena). Por otro lado, los genes asociados al cáncer pueden alterarse por mecanismos que modifican la expresión del gen sin alterar la estructura del ADN (por ejemplo, a través de cambios epigenéticos) o cambios en el procesamiento de los ARNm.

El 90% de los genes alterados en cáncer presentan mutaciones en las células somáticas, un 20% muestran mutaciones germinales y un 10% tienen ambos tipos de mutaciones. Los genes cuyas alteraciones se han asociado a cáncer se puede clasificar en tres clases principales: protooncogenes, genes supresores de tumor y genes de reparación del ADN. Más recientemente, se ha incorporado una cuarta clase de genes cuya alteración se asocia a las etapas finales de la progresión tumoral, los metastogenes y los genes supresores de la metástasis.

Si bien está teoría del origen del cáncer por mutaciones somáticas es la que tiene mayor consenso, algunos hallazgos la han puesto en duda como única explicación al origen del cáncer. Se sabe que la capacidad de una célula de generar tumores está, en parte, condicionada por el contexto donde la misma se encuentra. Así surgió otra teoría que indica que la carcinogénesis representa un problema de organización tisular, comparable con la organogénesis, y que actúa inicialmente alterando las interacciones normales entre las células y su entorno. La pérdida de interacción entre la célula tumoral y el microambiente circundante haría que la célula pierda su referencia, induciéndola a proliferar en forma excesiva. Por otro lado, se le ha dado cada vez más peso al papel del estroma como promotor (y quizás también en algunos casos como iniciador) de la progresión tumoral. Esto ha llevado, entonces, a preguntarse si las mutaciones genéticas son las que originan el cáncer o, en realidad, el proceso canceroso origina las mutaciones genéticas. Sin duda, es muy posible que ambos mecanismos coexistan y que estén interconectados.

Normalmente, las células de un organismo se dividen para formar células nuevas a medida que se necesitan. Cuando las células envejecen o se dañan, estas mueren y nuevas células toman

su lugar. Cuando se desarrolla un cáncer, este proceso ordenado falla y, a medida que se vuelven más inestables genéticamente, las células dañadas pueden sobrevivir. Esto trae como resultado el aumento descontrolado de su número que, en muchos casos genera un tumor sólido. Sin embargo, no todos los cánceres causan tumores sólidos ya que, por ejemplo las leucemias, se desarrollan sin generar masas tumorales.

Además de un crecimiento descontrolado, la célula cancerosa debe tener un fenotipo maligno, esto es, que tenga capacidad de propagarse e invadir los tejidos vecinos o, incluso, a distancia. A diferencia del cáncer, los tumores benignos, que se desarrollan también a causa de un crecimiento celular descontrolado, nunca invaden otros tejidos u órganos y, normalmente, no vuelven a crecer luego de su extirpación.

Un cáncer puede originarse en cualquier tejido del organismo. El cáncer más común en el adulto es el **carcinoma**, desarrollado a partir de células epiteliales de revestimiento y glandulares. Los **sarcomas** son cánceres originados en células de los tejidos conectivos y sus derivados (hueso, cartílago, grasa y músculo). Por otro lado, los **linfomas** se originan en ganglios linfáticos y tejidos del sistema inmune y las **leucemias** son cánceres de las células inmaduras de la sangre que crecen en la médula ósea, y que se acumulan en grandes cantidades en la sangre.

En el año 2000, Hanahan y Weinberg describieron los “*Hallmarks of cancer*”, las principales características que distinguen al cáncer. En aquel momento definieron seis alteraciones esenciales que, en conjunto, determinan un crecimiento maligno: autosuficiencia de señales de crecimiento, insensibilidad a las señales de control del crecimiento, evasión de la muerte celular programada, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida e invasión tisular capacidad de formar tumores a distancia o metástasis (Figura 1) (1).

**-Autosuficiencia de señales de crecimiento:** Las células normales necesitan recibir señales de crecimiento para inducir un proceso mitogénico y de proliferación. Estas señales extracelulares, que provienen del microambiente, actúan como nexos funcionales entre el entorno y la maquinaria que controla el ciclo celular y, son recibidos, generalmente, en la membrana plasmática donde se encuentran los receptores específicos de cada señal. Las células tumorales, por el contrario, se vuelven independientes de estas señales mediante básicamente, tres tipos de estrategias. La primera implica que éstas son capaces de producir sus propios factores de crecimiento desarrollando una estimulación autócrina. La segunda involucra a los receptores de membrana para las señales de crecimiento que, entre otras modificaciones, pueden estar sobreexpresados o mutados aumentando la transmisión de la señal de proliferación y crecimiento. Incluso, a veces, los receptores mutados pueden generar señales mitogénicas *per se*, aún en ausencia de factores de crecimiento. Por último, la más compleja de las estrategias, involucra



cambios en la red de señales mitogénicas intracelulares que, a grandes rasgos, independizan a las células tumorales de las señales de crecimiento y de sus receptores específicos.

**-Insensibilidad a las señales de control del crecimiento:** En un tejido normal, muchas señales anti-proliferativas actúan para mantener la homeostasis. Estas señales incluyen inhibidores de los factores de crecimiento solubles e inhibidores embebidos en la matriz extracelular o localizados en la membrana de células vecinas. Las señales anti-proliferativas principalmente actúan sobre moléculas reguladoras del ciclo celular. Las células tumorales presentan alteraciones en el sistema molecular de control del ciclo celular, ya sea por mutaciones génicas que inducen alteraciones estructurales o disponibilidad de la proteína o bien, por modificaciones postraduccionales. En todos los casos la correcta progresión a través del ciclo celular se ve desregulada.

**-Evasión de la muerte celular programada o apoptosis:** El crecimiento descontrolado de las células tumorales no sólo se da por un aumento de la tasa de replicación, sino también por una disminución de la tasa de muerte. La resistencia a la apoptosis que presentan las células tumorales puede ser adquirida a través de variadas estrategias. La más conocida implica al gen supresor tumoral p53. La inactivación de la proteína p53, componente clave en la identificación del daño al ADN, se observa en cerca del 50% de los cánceres.

Estas tres características convergen en un **potencial replicativo ilimitado** de las células tumorales. Uno de los principales problemas que deben sobrellevar estas células es el acortamiento de los telómeros, porción terminal de los cromosomas compuesta de secuencias repetidas de ADN que protegen del acortamiento cromosomal como consecuencia de su replicación. La mayoría de las células tumorales sobreexpresan la enzima telomerasa, encargada de mantener el largo de los telómeros e inhibir la crisis celular producida por el acortamiento cromosomal, asegurándose así una replicación ilimitada.

**-Angiogénesis sostenida:** El oxígeno y los nutrientes provistos por el sistema circulatorio son cruciales para la función y la supervivencia celular lo que obliga, a todas las células de un tejido, a no residir a mas de 100µm de un capilar sanguíneo. Para mantener una tasa de crecimiento sostenido, todo tumor debe desarrollar la capacidad de vascularizarse por lo que la angiogénesis se convierte en un paso crucial del crecimiento tumoral. Las células tumorales secretan factores de crecimiento que estimulan la proliferación de células endoteliales cercanas por unión a sus receptores tirosina-quinasa. El *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) es el más conocido y estudiado. En un principio, los tumores no generan este tipo de factores pero en un momento determinado del crecimiento tumoral, que se llama “*switch* angiogénico”, el tumor induce la formación de nuevos vasos a partir de los existentes cercanos.

Los vasos producidos dentro de los tumores por angiogénesis activada constitutivamente y por señales proangiogénicas no balanceadas, son típicamente aberrantes. La vasculatura tumoral se caracteriza por la formación de vasos precarios, tortuosos y muy ramificados con un consecuente flujo sanguíneo errático y microhemorragias, compuestos de células endoteliales con niveles de proliferación y apoptosis aberrantes (2,3). Actualmente, es sabido que los nuevos vasos también pueden formarse en ausencia de vasos preexistentes, a partir de células endoteliales precursoras (angioblastos) que migran y se diferencian en respuesta a claves locales. Este proceso de formación de vasos de novo se denomina vasculogénesis. Los vasos formados de novo se remodelan y extienden posteriormente por angiogénesis (4).

**-Invasión tisular y metástasis:** La capacidad de invadir y metastatizar les permite, a las células tumorales, escapar del tumor primario y colonizar nuevos tejidos dónde, al menos al principio, la disponibilidad de nutrientes y espacio no es limitante. La invasión y la metástasis son procesos altamente complejos. Uno de los principales eventos que ocurre es la modificación de las proteínas asociadas con el anclaje de la célula a la matriz extracelular y a otras células como las integrinas y las cadherinas (dependientes de calcio). Una de las cadherinas más estudiada es la E-cadherina cuya función se pierde en muchas células epiteliales tumorales por mutación o proteólisis de la porción extracelular, facilitando la pérdida de la adhesión célula-célula. Otro evento sumamente importante en la invasión y metástasis involucra a las proteasas extracelulares, entre las que se encuentran las metaloproteasas. Los genes de estas enzimas están sobreexpresados y los de sus inhibidores muchas veces están silenciados, lo que resulta en un balance tal que se induce la desorganización de la matriz extracelular. Esto permite, a la célula tumoral, movilizarse hacia los vasos sanguíneos para llegar a otros tejidos y órganos.

Una vez que las células tumorales ingresaron en los vasos sanguíneos o linfáticos, se enfrentan a un microambiente totalmente diferente. Menos del 0,01% de decenas de miles de células tumorales que alcanzan la circulación a diario sobrevive para originar metástasis (5). La sangre es un microambiente particularmente hostil debido a la presión de la circulación sanguínea que puede causar la destrucción mecánica de las células y a la vigilancia de las células del sistema inmune, en particular las células citotóxicas naturales. No obstante, es posible que las células tumorales circulantes aumenten sus probabilidades de supervivencia mediante distintos mecanismos, como por ejemplo utilizar las plaquetas como protección.

Finalmente, en el último paso del desarrollo metastásico, la célula tumoral debe proliferar para formar nódulos pequeños (micrometástasis) que eventualmente crecerán para dar lugar a tumores macroscópicos ("colonización"). Cabe recalcar que la colonización no siempre implica desarrollo metastásico ya que muchos pacientes presentan miríadas de micrometástasis que nunca

progresarán. El lapso temporal entre el asentamiento de la célula tumoral en un órgano distante y la colonización, constituye un período de latencia metastásica. Por otro lado, se acepta que las metástasis establecidas tienen el potencial de reiniciar la cascada y diseminarse a sitios terciarios, constituyéndose en metástasis de metástasis.

El modelo clásico de formación de metástasis se denomina progresión tumoral lineal y se caracteriza por el incremento de la malignidad de las células localmente en el tumor primario hasta alcanzar todas las capacidades que le permitirán originar metástasis. Por otro lado, evidencias clínicas y experimentales sugirieron un segundo modelo, la progresión tumoral paralela, según el cual las células abandonarían muy temprano el tumor primario y adquirirían la capacidad metastásica en los sitios distantes, en forma paralela a la evolución del tumor de origen. Estos modelos de progresión maligna se deben tener en cuenta a la hora de establecer criterios de diagnóstico y tratamientos adecuados.

En 2011, Hanahan y Weinberg reescribieron los “*Hallmarks of cancer*” adjudicando cuatro características más a las células tumorales: reprogramación metabólica, evasión del sistema inmune, inestabilidad genómica e inflamación promovida por el tumor. Las últimas dos se describieron como habilitantes del resto de los “*hallmarks*” (6) (Figura 1).

**-Inestabilidad genómica:** En general, las células con mutaciones ligadas al cáncer adquieren una propiedad que se llama inestabilidad genómica, que implica que se vuelven cada vez más propensas a sufrir mutaciones adicionales. Por lo tanto, las mutaciones continúan acumulándose y finalmente llevan, a la célula, a adquirir ciertas ventajas de proliferación y supervivencia, conduciendo a la progresión tumoral.

**-Inflamación promovida por el tumor:** se ha descrito ampliamente la invasión de los tumores por células del sistema inmune innato y adaptativo provocando condiciones inflamatorias que, originalmente, se asociaron con el intento del sistema inmune de erradicar el tumor. Sin embargo, en los últimos años se evidenció que la inflamación asociada al tumor producía el efecto paradójico de estimular la tumorigenicidad y la proliferación. La inflamación puede contribuir a la adquisición de “*hallmarks*” ya que abastece de moléculas, como factores de crecimiento, moléculas inhibitorias de la muerte celular, moléculas proangiogénicas, enzimas que modifican el microambiente y la matriz extracelular y otras moléculas inductoras de tumorigenicidad.

**-Reprogramación metabólica:** La replicación sostenida requiere de un ajuste de las vías energéticas de la célula tumoral para abastecer del combustible necesario para el crecimiento y la división celular. En condiciones normales de disponibilidad de oxígeno, las células normales procesan la glucosa y obtienen piruvato que, en la mitocondria ingresa en el ciclo de Krebs y la

fosforilación oxidativa liberando dióxido de carbono y agua y abasteciendo a la célula de energía. En condiciones de baja disponibilidad de oxígeno, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativas son reemplazadas por una glucólisis anaeróbica con consecuente producción de ácido láctico. Las células tumorales "prefieren" realizar glucólisis láctica aún en condiciones normales de disponibilidad de oxígeno, lo que les provee de las biomoléculas necesarias para la alta tasa replicativa aún cuando el rendimiento energético es bajo. A su vez, la producción de ácido láctico genera un microambiente ácido, propicio para la remodelación de la matriz extracelular, y la posterior movilización de las células estimulando un fenotipo más maligno.

**-Evasión del sistema inmune:** Las células y tejidos son constantemente vigilados por el sistema inmune. Esta vigilancia es responsable del reconocimiento y la eliminación de la mayoría de las células de un tumor incipiente. De acuerdo con esta teoría, los tumores detectables son aquellos que han evadido al sistema inmune. Las células tumorales pueden inactivar los componentes del sistema inmune responsables de disparar su eliminación. Así, cuando las células tumorales son detectadas clínicamente, ya han pasado por la etapa de evasión del sistema de defensa inmune. Durante el largo proceso de progresión, las células pueden haber perdido los antígenos inmunogénicos y haber adquirido propiedades inmunosupresivas a través de diferentes mecanismos.



Figura 1: Características de las células cancerosas<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Adaptado de Hanahan y Weinberg (2011)

## **CARCINOMA CELULAR RENAL**

El Carcinoma Celular Renal (CCR), representa el cáncer urológico más letal. Este cáncer posee una incidencia mundial en zonas desarrolladas, del 1,5% en hombres y de 0,7% en mujeres, siendo la mortalidad del 0,5% en hombres y del 0,2% en mujeres (7). En nuestro país, según el "Atlas de Mortalidad por Cáncer en Argentina", la mortalidad debida a la portación de CCR fue de 3,6% en hombres y 2% en mujeres, entre el período 2007-2011 (8). Las razones que explican el pronóstico pobre de este cáncer son su diagnóstico clínico tardío y la resistencia a la quimioterapia convencional, lo que lo convierte, una vez diseminado, en una enfermedad incurable.

El CCR engloba a un grupo heterogéneo de subtipos tumorales que incluyen distintos tipos histológicos: el CCR de células claras (CCRcc), responsable del 70-80% de todos los CCR; el CCR papilar (tipo I y II), responsable del 11-15%; el CCR cromóforo (CCRcrb), del 5% y, otros tipos menos frecuentes (9). Esta clasificación es limitada, ya que pacientes con el mismo diagnóstico histopatológico pueden evolucionar en forma muy distinta. Estudios más recientes indican que cada uno de estos subtipos histológicos se asocia a mutaciones específicas, que pueden subdividirse de acuerdo con la presencia de alteraciones moleculares particulares (10,11). Sin duda, los estudios de biología molecular permitirán no sólo lograr una mejor clasificación de los CCR, sino que también ayudarán a detectar nuevos blancos terapéuticos y biomarcadores de diagnóstico y pronóstico, y contribuirán así a mejorar el manejo del paciente con CCR y a aumentar su supervivencia.

### **Diagnóstico clínico de CCR**

Según las pautas de Oncología del Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo", ante la sospecha semiológica clínica de un tumor, mediante ecografía o por hallazgo incidental en otros estudios por imágenes, se diagnostica una Masa Ocupante Renal (MOR). Esta puede ser sólida, quística o presentar características que la hacen dudosa.

Si la masa se define como sólida, se indica, preferentemente, la realización de una Resonancia Magnética por Imágenes (RMI) con gadolinio, o una Tomografía Computada (TC), con contraste oral e intravenoso. La RMI define si la masa sólida tiene componente de tejido graso o no. Si se trata de un tumor sin componente graso, existe la posibilidad de que se trate de carcinoma renal para lo que se indica estadificación y posterior cirugía (nefrectomía).

La estadificación se realiza mediante la evaluación de la Historia Clínica (HC), de los análisis clínicos, incluyendo la fosfatasa alcalina en el hepatograma y la calcemia. Además, se indica la realización de una TC de tórax sin contraste, preferentemente (o radiografía de tórax), o RMI de

abdomen y pelvis con gadolinio, preferentemente (o TC de abdomen y pelvis sin y con contraste), para determinar la presencia de metástasis. Si la fosfatasa alcalina y/o la calcemia estuvieran elevadas o existiera dolor óseo, se realizará un centellograma óseo. Luego de la cirugía, la anatomía patológica contribuye a determinar el tipo histológico y el tamaño tumoral, además del estado de los ganglio linfáticos (12).

### **Biología molecular de los CCR**

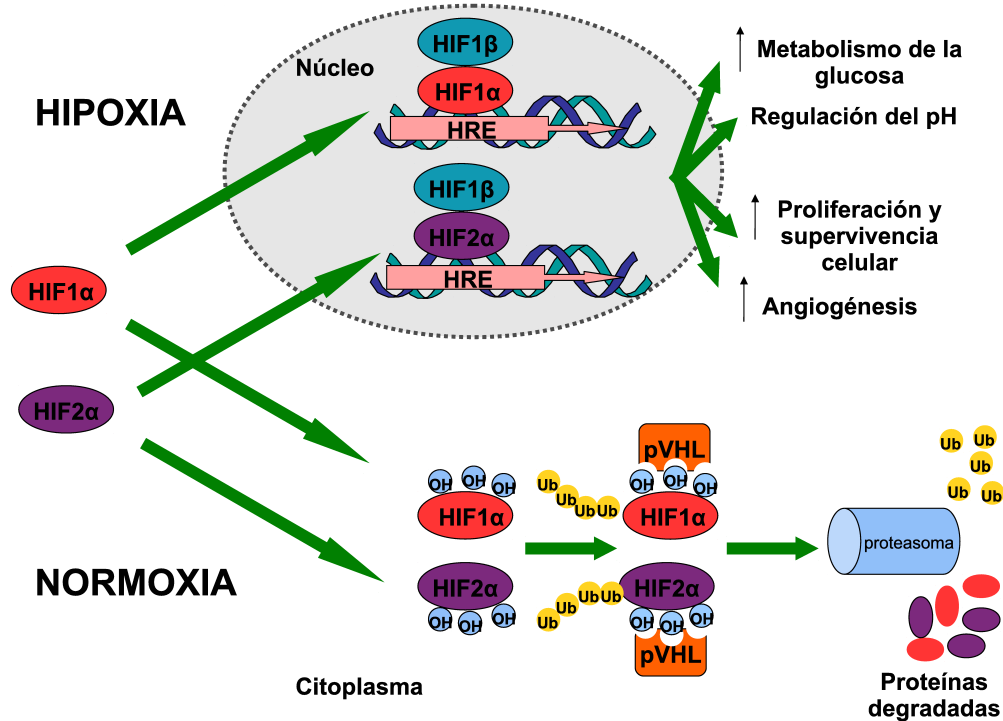
La identificación de los genes implicados en los diferentes tipos de CCR ha sido promovida por el estudio de los síndromes del CCR hereditario. Estos estudios han permitido determinar que los genes más implicados están asociados con la desregulación de vías metabólicas involucradas en caminos energéticos, en relación a la detección de variaciones en la concentración de nutrientes, oxígeno e hierro. Esto ha llevado a que, actualmente, se considere al CCR y, en particular, al CCRcc como una enfermedad metabólica (13,14). A continuación, se describirán los últimos conocimientos sobre las vías moleculares desreguladas en los CCR de mayor incidencia.

#### **a. CCR de células claras (CCRcc)**

Si bien el CCRcc es el subtipo predominante de los CCR, su historia natural es heterogénea y difícil de predecir. Este tipo de cáncer se ha asociado con la pérdida de funcionalidad del gen de von Hippel-Lindau (VHL), tanto en la forma familiar de la enfermedad como en la mayoría (~90%) de los casos esporádicos (15). La herencia de una copia defectiva del gen VHL predispone a la persona portadora al desarrollo del CCRcc en el marco del síndrome VHL. Sin embargo, para que se desarrolle un cáncer es necesaria la inactivación somática del otro alelo. La inactivación o pérdida de este gen no se ha encontrado en otros tipos histológicos, lo que sugiere que el VHL está relacionado específicamente con el CCRcc. Está claro que la inactivación del VHL es un factor iniciador de la tumorigénesis, pero se requieren mutaciones adicionales en otros genes para que se desarrolle un cáncer.

En el CCRcc, se han detectado muchas alteraciones moleculares en los mecanismos normales de homeostasis y metabolismo que ocurren en respuesta a la hipoxia, que generan un estado conocido como pseudohipoxia (activación de las vías de señalización que normalmente se activan en condiciones de hipoxia, pero en condiciones normales de oxígeno). La molécula del VHL es central en este proceso. El producto del gen VHL, la proteína pVHL, es un componente de un complejo multiproteico, cuya función es marcar proteínas para su degradación por el proteosoma (16). Una de las proteínas blanco es el Factor Inducible por Hipoxia  $\alpha$  (HIF $\alpha$ ), que facilita la

adaptación de la célula a la privación de oxígeno y del que se conocen dos isoformas principales, HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$ . Bajo condiciones de normoxia, HIF $\alpha$  es hidroxilada en determinados aminoácidos X (prolina) y así facilita su unión a la pVHL y su marcación, ubiquitinación, lo que la determina para ser degradada en el proteosoma (17). Pero en condiciones de hipoxia, esta hidroxilación está inhibida, HIF $\alpha$  no se degrada, se acumula y se une a la subunidad HIF1 $\beta$ , que está expresada constitutivamente. En ausencia de la pVHL (aun en condiciones de normoxia), HIF $\alpha$  no es marcada para su degradación y puede unirse a HIF1 $\beta$ . El dímero HIF $\alpha$ /HIF1 $\beta$  se une a elementos respondedores a hipoxia (HRE) en el ADN nuclear y activa o suprime la transcripción de genes blanco, que median la adaptación a las condiciones de hipoxia (Figura 2).



**Figura 2: HIF como molécula central en la respuesta celular a las variaciones en las concentraciones de  $O_2$ .**

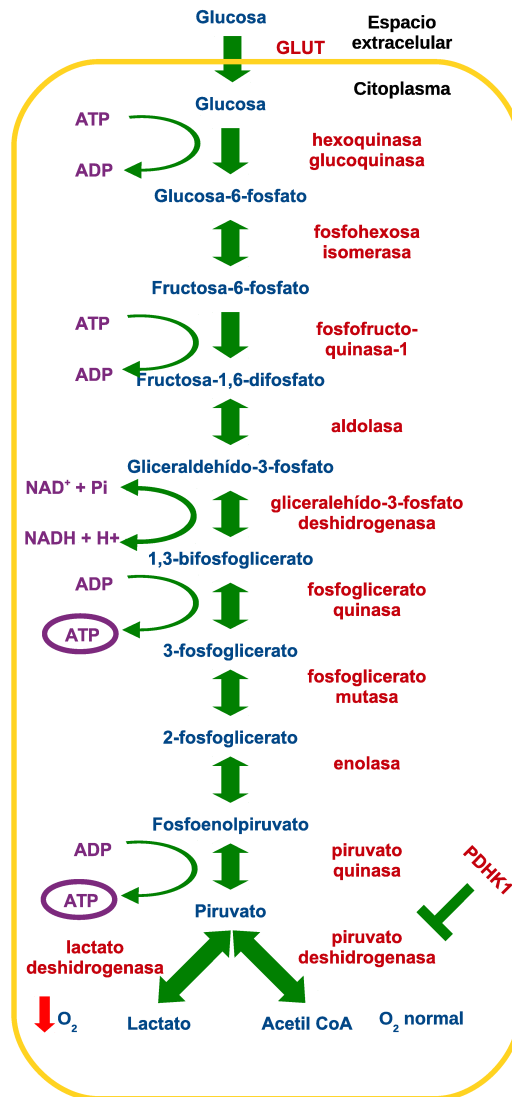
Si bien hay una superposición parcial en las funciones de las HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$ , los estudios *in vitro* e *in vivo* señalan que la proteína HIF2 $\alpha$  es crítica para el desarrollo del CCRcc. Se demostró que los pacientes con CCR que tienen mutaciones o hipermetilación en el gen VHL

pueden subdividirse en dos grupos: los que expresan los HIF1 $\alpha$ /HIF2 $\alpha$  y aquellos que sólo expresan el HIF2 $\alpha$  (18).

#### **a.1 CCRcc: desregulación de vías metabólicas**

Normalmente las células convierten la glucosa a piruvato mediante una serie de reacciones químicas conocidas en conjunto como glucólisis (Figura 3) que comienza con la incorporación del azúcar a través del transportador GLUT. Si la célula se encuentra en condiciones hipóxicas, de baja concentración de oxígeno, el piruvato es, principalmente, convertido en lactato por la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH). Este fenómeno se conoce como glucólisis láctica. Otra enzima involucrada en este fenómeno es Piruvato Deshidrogenasa Quinasa 1 (PDHK1) que regula la oxidación de glucosa, a través de la fosforilación inhibitoria de una subunidad del complejo Piruvato Deshidrogenasa (PDH), favoreciendo la formación de lactato. Por el contrario, en condiciones de normoxia, el piruvato es convertido en Acetil CoA, por la enzima PDH, e ingresa en la mitocondria como sustrato del ciclo de Krebs. De esta manera la célula obtiene el combustible necesario para realizar sus funciones a través de la conversión de la energía en ATP, almacenada en los nutrientes. Las células priorizan esta vía frente a condiciones normales de disponibilidad de oxígeno y nutrientes. Teniendo en cuenta el rendimiento energético en términos de moles de ATP producidos, la ruta del LDH es mucho menos efectiva ya que sólo rinde 2 moles de ATP. Sin embargo, minimiza los requerimientos de oxígeno y, por otro lado, los intermediarios de la glucólisis pueden ser utilizados para reacciones anabólicas indispensables para la supervivencia de la célula (síntesis de ácidos grasos, aminoácidos y nucleótidos)(19).





**Figura 3: Esquema representativo y simplificado de la glucólisis.**

Como se mencionó antes, en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes o de otros factores de estrés, como la hipoxia, las células sufren un cambio metabólico favoreciendo la producción de lactato como respuesta adaptativa. A diferencia de la célula no tumoral, que en condiciones normales obtiene la energía principalmente por el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa mitocondrial, la célula tumoral la obtienen principalmente por glucólisis, cuyo producto principal es el lactato. Este fenómeno se da, incluso, en presencia de oxígeno, por lo que se llama pseudohipoxia, y se lo conoce como “efecto Warburg” en honor a quien lo describiera hace casi un siglo atrás (20). Este hecho es central en las células del CCRcc, que obtienen su energía en forma primaria por glucólisis aeróbica sin impedir la proliferación sostenida.

En particular, HIF induce la expresión de proteínas de la maquinaria sintética que favorece la glucólisis anaeróbica. Uno de los genes que controla el dímero HIF $\alpha$ /HIF1 $\beta$  es aquel que codifica para la proteína GLUT1 (transportador de glucosa), ubicada en la membrana plasmática, hecho que resulta en un aumento de la incorporación de glucosa a la célula tumoral. Además, el dímero estimula la transcripción de otras enzimas clave del camino glucolítico, lo que, en conjunto, induce a un aumento significativo de la glucólisis. Este metabolismo promueve un fenotipo maligno a través de la inducción de varios oncogenes y de la creación de un microambiente ácido que protege a la célula tumoral del sistema inmune y favorece el perfil maligno de las células tumorales (21).

Otro gen bajo regulación del dímero HIF $\alpha$ /HIF1 $\beta$  es el de la enzima LDH. Como resultado de la transcripción de LDH, por estabilización de HIF $\alpha$ , se contribuye a reducir el pH del microambiente tumoral, con las consecuencias ya mencionadas.

La expresión de la enzima Anhidrasa Carbónica IX, CAIX, también está regulada por HIF $\alpha$ /HIF1 $\beta$  y la inactivación de VHL (22). Las anhidrasas carbónicas son glicoproteínas citosólicas, pero también se localizan en la membrana y catalizan reacciones químicas críticas en la regulación del flujo de protones y, por lo tanto participan en la regulación del pH. En particular, CAIX está involucrada en la acidificación del microambiente extracelular y en la supervivencia clonogénica en condiciones de hipoxia.

En los CCRcc, también se han descrito alteraciones en el camino de las pentosas fosfato y en el metabolismo de los lípidos (13). Un ejemplo de ello es que las células CCRcc contienen un exceso de colesterol total y, más específicamente, de colesterol esterificado (~35 veces más que una célula renal normal) (23). Aunque la acumulación de colesterol libre es citotóxica, las células de cáncer renal se protegen por expresar altos niveles de una enzima que cataliza la formación de ésteres de colesterol (ACAT o *Acetyl-CoA Cholesterol Acetyl Transferase*) (24).

La vía de fosfoinositol quinasa (PI3K)/AKT, constitutivamente activada en el CCRcc, induce también, un aumento de la glucólisis y una reducción de la fosforilación oxidativa. La hiperactivación de AKT induce a la glucólisis aeróbica mediante varios mecanismos no excluyentes. Es relevante destacar que la hiperactividad de AKT también aumenta la actividad de la serino-treonina quinasa, *mammalian Target of Rapamycin*, (mTOR) e incrementa, a su vez, los efectos glucolíticos asociados a HIF y la síntesis proteica requerida para el desarrollo tumoral (25). Por otro lado, HIF1 $\alpha$  es también regulado por mTOR (Figura 4).

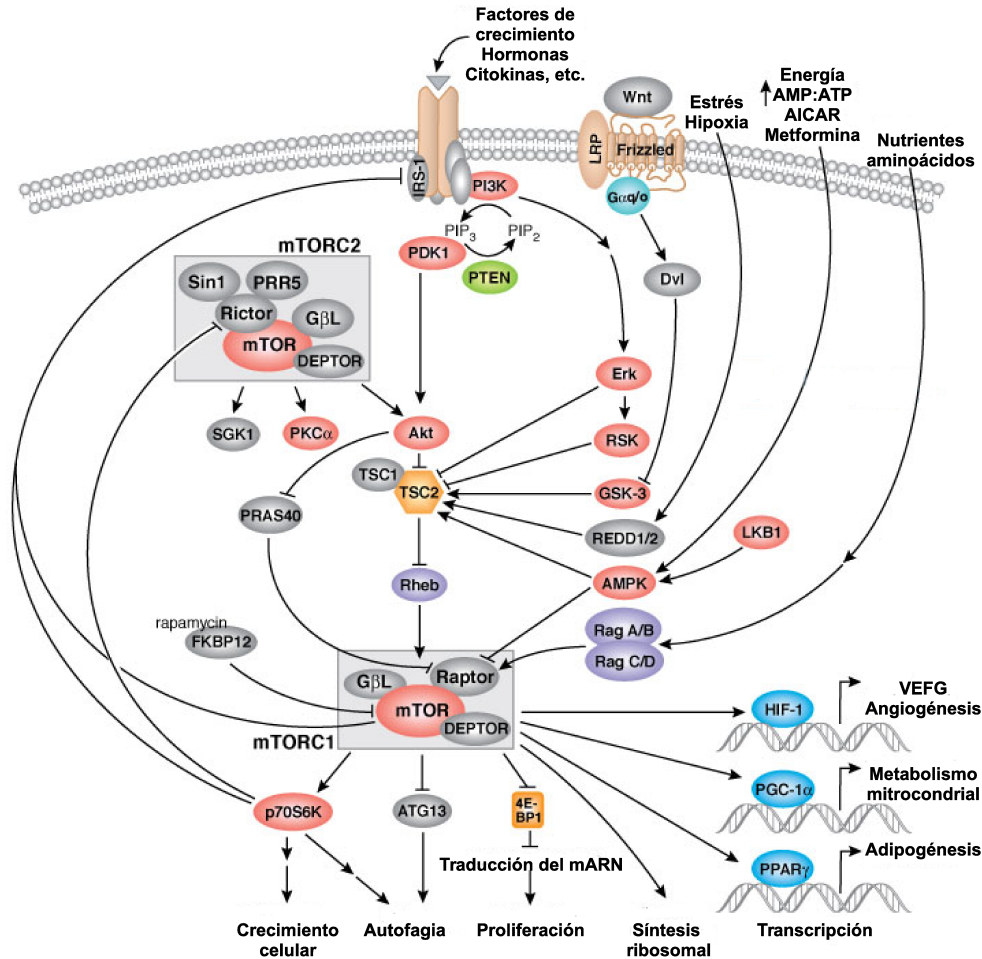


Figura 4: Vía de señalización de mTOR.

#### a.1 CCRcc: Aumento de la actividad en vías angiogénicas

Los genes involucrados en la angiogénesis y en la respuesta a la hipoxia también son regulados por el dímero HIF $\alpha$ /HIF1 $\beta$ . Un ejemplo es el VEGF, cuya actividad es crucial en la progresión tumoral. El VEGF se une a sus receptores de membrana con actividad tirosina-quinasa VEGFR1 y VEGFR2, que al activarse gatillan varios caminos de señalización que resultan en la proliferación de la célula endotelial, la migración y la degradación de componentes de la matriz extracelular (26). El VEGF, en particular, está sobreexpresado en la mayoría de los CCR, principalmente en aquellos asociados a la inactivación del gen supresor tumoral VHL. Otras moléculas moduladoras del proceso angiogénico desreguladas en el CCRcc son: la Angiopoyetina-1 que recluta pericitos (células mesenquimáticas asociadas a las paredes de los pequeños vasos sanguíneos, que estabilizan los brotes angiogénicos); el PDGF (químico-atractivo para los

precursores de los pericitos) y la Osteopontina (capaz de promover la migración de las células endoteliales junto con el VEGF) (27,28).

### **a.3 CCRcc: otras alteraciones moleculares**

Datos recientes indican que en la biología del CCRcc hay una marcada contribución de moléculas que participan en la remodelación de la cromatina y, por ende, en el control transcripcional. Se han identificado mutaciones en el gen PBRM1, componente del complejo “remodelador de cromatina” en el ~40% de los tumores CCRcc primarios, y mutaciones en los genes que codifican para enzimas metilantes o desmetilantes de la histona 3 (29).

### **b. El CCR papilar y la vía de señalización que regula la Transición Epitelio Mesenquimática (TEM).**

El síndrome de CCR papilar hereditario, Hereditary Papillary (RCC o HPRC), está asociado a un mayor riesgo de padecer tumores renales papilares multifocales de tipo I. A fines de la década de los noventa, se identificó al protooncogén *Hepatocyte Growth Factor Receptor* (MET) como responsable del síndrome HPRC (30). Se han detectado mutaciones con ganancia de actividad o sobreexpresión del gen MET no sólo en la línea germinal de pacientes con HPRC, sino también en un subgrupo de CCR papilares tipo I sin mutación germinal.

MET codifica para un receptor tirosina-quinasa de membrana activable por el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). Tanto el gen del receptor como el del ligando se localizan en el cromosoma (Cr) 7 y, es posible detectar una trisomía de este Cr en el 75% de los HPRC. Cuando el HGF se une y activa al receptor MET, gatilla vías de señalización asociadas con la TEM, la mitogénesis, la supervivencia, la morfogénesis y la motilidad celular (31).

La TEM es un proceso fundamental durante el desarrollo embrionario y la reparación tisular, así como también durante la invasión tumoral. En este caso, las células epiteliales pierden la adhesión célula-célula, especialmente asociado a la pérdida de E-cadherina, y la polaridad ápico-basal, se remodela el citoesqueleto, se incrementa la motilidad y las células adquieren un fenotipo invasor y metastático. Una vez que las células tumorales migran al sitio “blanco” de la metástasis, reexpresan E-cadherina y otros marcadores epiteliales, proceso que se conoce como transición mesenquimático-epitelial (TME). Además, cuando el receptor MET está desregulado y constitutivamente activado, promueve la activación de HIF1 y afecta las vías de PI3K/AKT y mTOR (32).

### **c. Otros tipos de CCR y sus alteraciones moleculares**

La esclerosis tuberosa es una enfermedad genética multi-sistémica poco común, que causa angiofibromas cutáneos, linfoangiomiomatosis pulmonar y tumores renales, siendo el más frecuente el angiomiolipoma (aunque se han detectado otros tumores renales incluyendo el CCRcc). En estos pacientes, se han encontrado mutaciones inactivantes germinales en los genes *Tuberous Sclerosis Protein 1* y *2* (TSC1 y TSC2). En condiciones normales, las proteínas TSC1/2 forman una estructura dimérica que inhibe la actividad de la vía mTOR (Figura 4). Esta vía está desregulada en las células tumorales con mutaciones en TSC1/2, y los procesos de traducción y síntesis proteica están alterados, lo que podría resultar en la acumulación de HIF $\alpha$  (33).

El síndrome de Birt-Hogg-Dubé (BHDS) también es una enfermedad genética asociada a un mayor riesgo de padecer lesiones papilares de la piel, neumotórax y neoplasias renales; la mayoría de estos tumores son histológicamente similares al CCR cromóforo y al oncocitoma renal esporádico. Los tumores podrían presentarse con características de bilateralidad, multifocalidad y capacidad metastásica. En la mayoría de los pacientes con BHDS, se detectaron mutaciones en la línea germinal de la proteína *Folliculin* (FLCN), considerada un supresor tumoral y un regulador de la función mitocondrial (34). Cabe aclarar que la mayoría de los CCR esporádicos no muestran alteraciones en la FLCN.

La patología de leiomiomatosis hereditaria y cáncer de células renales (HLRCC) se caracteriza por la presencia de leiomiomas cutáneos y uterinos y por la presencia de CCR agresivos en el 10-15% de los casos. Los tumores renales asociados a HLRCC presentan una histoarquitectura mixta, o sea que pueden ser papilares (CCR papilar tipo II), tubulopapilares o mixtos. El gen responsable de esta patología codifica para la enzima Fumarato hidratasa (FH), cuya inhibición conduce a un aumento de los niveles de fumarato, que inhibe la degradación del HIF $\alpha$  e induce a su acumulación (35). Trabajos recientes demostraron que líneas celulares derivadas de pacientes HLRCC con mutaciones en FH son casi totalmente dependientes de la glucólisis para la producción de energía (36).

Por otro lado, en pacientes con CCR que tienen una historia familiar de feocromocitoma o paraganglioma, se han detectado mutaciones germinales en tres de los cuatro genes que codifican para las Succinato Deshidrogenasa B (SDHB), una subunidad de la enzima mitocondrial Succinato Deshidrogenasa (SDH), lo que podría impedir la fosforilación oxidativa y conducir a las células tumorales a depender de la glucólisis (37).

## MARCADORES TUMORALES

Un **marcador tumoral o biomarcador del cáncer** es un indicador, objetivamente medido y evaluado, generalmente característico de un proceso biológico normal, pero que se encuentra cuali o cuantitativamente alterado durante la enfermedad oncológica. El marcador puede estar relacionado, entre otros, con la expresión de características biológicas involucradas en la transformación celular, crecimiento tumoral y/o progresión tumoral. El mismo puede ser producido por el tumor o por otras células del paciente con cáncer en respuesta a la presencia tumoral y detectarse, a nivel celular o molecular, en tejidos, células circulantes, fluidos biológicos (sangre, orina u otros), componentes volátiles y no volátiles del aliento, etc.

### Parámetros utilizados para definir la utilidad de un marcador

Para definir la bondad de un marcador tumoral se utilizan ciertos parámetros, que son los mismos que se usan para otras patologías (Tabla I). Así, la **Sensibilidad** se refiere a la proporción de sujetos con enfermedad confirmada a quienes la prueba o test para el marcador en cuestión da positivo. La **Especificidad** se refiere a la proporción de sujetos controles, sin enfermedad, a quienes el test para el biomarcador da negativo. Otros parámetros usados son el **Valor Predictivo Positivo (VPP)**, definido como la probabilidad de que haya enfermedad en un paciente cuando el resultado de la prueba es positivo y, el **Valor Predictivo Negativo (VPN)**, probabilidad de no tener enfermedad cuando el resultado del test es negativo.

Prueba	Enfermedad	
	Presente	Ausente
Positiva	Verdadero positivo A	Falso positivo B
	Falso negativo C	Verdadero negativo D

$$\text{Sensibilidad} = \frac{A}{A+C} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{D}{D+B} \times 100$$

$$\text{VPP} = \frac{A}{A+B} \times 100$$

$$\text{VPN} = \frac{D}{D+C} \times 100$$

Tabla I: Principales parámetros en el estudio de biomarcadores.

El uso de paneles de biomarcadores es, sin duda, una alternativa promisorio para reducir el número de falsos positivos y negativos, que se observan al estudiar un marcador individual.

### **Moléculas a estudiar en la búsqueda de biomarcadores**

**a) ADN:** Estudios de fusión génica resultante de translocaciones, amplificaciones, mutaciones génicas, cambios microsatelitales, etc.

**b) Epigenética:** La metilación del ADN, las modificaciones de histonas, la estructura de la cromatina, juegan un rol central en la regulación de la organización del genoma. Así, por ejemplo, la hipermetilación de promotores de genes se ha asociado con su inactivación, pero también la hipometilación del genoma está siendo objeto de estudio. Si bien es posible analizar el estado de metilación de determinados genes particulares, actualmente hay tecnología en desarrollo para el estudio del estado global de metilación del ADN (a nivel genómico) y esto tiene una potencialidad para la búsqueda de nuevos biomarcadores oncológicos (38).

**c) ARN:** PCR, PCR cuantitativa, matrices (arrays: para el estudio simultáneo de la expresión de miles de genes), etc, a partir de ARN tumoral. Los microARNs (miARNs), ARN no codificante que regulan la traducción y la degradación de ARNm blancos y que controlan ~ el 30% de los genes humanos, también están siendo ampliamente estudiados como biomarcadores. Incluso el suero y otros fluidos biológicos contienen suficiente cantidad de ARN para hacer este tipo de estudios.

**d) Proteínas/Péptidos:** alteraciones estructurales (proteínas con mutaciones puntuales o truncadas), modificaciones post-traduccionales, cambios en la actividad funcional o localización, expresión alterada (incremento/disminución), etc. Últimamente se pueden estudiar los patrones proteómicos (varios cientos de polipéptidos en forma simultánea) mediante distintas tecnologías (por ejemplo: Maldi-TOF). El plasma/suero, además de las proteínas clásicas, contiene proteínas marcadoras potenciales de alteraciones tisulares.

**e)** También hay varios estudios que intentan utilizar **cambios en la funcionalidad** de una molécula como biomarcador. Así, el estudio de la actividad de una enzima involucrada en la invasión tumoral aporta gran información, más allá de si la proteína está sobreexpresada o no.

**f) Metabolitos:** productos intermediarios o finales del metabolismo. La metabolómica es el conjunto de ciencias y técnicas dedicadas al estudio global del conjunto de moléculas, en tejido o fluidos, que constituyen los intermediarios metabólicos (metabolitos), que pueden encontrarse en un sistema biológico.

### **Clasificación de los biomarcadores según su utilidad clínica**

**a) Detección temprana:** Para *screening* y detección del cáncer en sus etapas iniciales.

**b) Diagnóstico:** Se utilizan para determinar la presencia o no de cáncer. También son útiles para determinar el origen de un tumor indiferenciado, en los cuales, además del estudio de la

morfología celular, se usan métodos inmunohistoquímicos que permitan determinar la estirpe celular del tumor (epitelial, mesenquimático, nervioso, etc). Este punto es importante, también, en el caso de pacientes que debutan con metástasis y el origen del tumor primario es desconocido. En general, se usan varios marcadores para definir el origen celular. Los marcadores diagnósticos permiten clasificar el tumor como perteneciente a una categoría amplia, por ejemplo “Carcinoma” o bien permitir un diagnóstico más preciso, como “Carcinoma de Células Escamosas”.

**c) Clasificación:** En los últimos años el estudio del patrón de expresión de miles de genes usando cADN microarray ha permitido la reclasificación de los tumores por criterios moleculares. Un ejemplo pionero es el trabajo de Perou *et al.* y Sorlie *et al.* quienes reclasificaron los tumores de mama en los siguientes grupos: ERB B2+, Tipo Mama Normal, Tipo Basal, Luminal tipo A, Luminal tipo B y C (39,40).

**d) Estadificación:** Estos marcadores permiten evaluar si algunas células se han escapado del tumor primario. Así, por ejemplo, se busca reconocer micrometástasis en médula ósea o en ganglios linfáticos drenantes.

**e) Seguimiento o monitoreo de la enfermedad:** Estos marcadores se emplean con el fin de detectar en forma anticipada (antes de la clínica) la recurrencia local y/o metástasis. También son útiles para la detección de tumor mínimo residual.

**f) Pronóstico:** Se utilizan para determinar el comportamiento de un tumor y predecir su agresividad, lo que permite delinear grupos de pacientes más homogéneos. Estos biomarcadores son capaces, en el momento del diagnóstico, de informar sobre la evolución clínica que tendrá el paciente, lo que permite determinar las probabilidades de **supervivencia libre de enfermedad** (SLE: período de tiempo desde el diagnóstico tumoral hasta la recaída) o de **supervivencia global** (SG ó SVG: período de tiempo desde el diagnóstico tumoral hasta la muerte). En estudios donde se comparan distintos grupos de individuos (por ejemplo: positivo o negativo para un determinado biomarcador) la SLE o SVG puede graficarse de diferentes formas, siendo una de la más frecuente las curvas de Kaplan-Meier.

**g) Predictivo o de respuesta al tratamiento:** Se utilizan para establecer si la quimioterapia u otras terapias serán efectivas. Estos marcadores permiten la selección de pacientes con alta probabilidad de responder a algún tipo de tratamiento. Un factor predictivo puede ser también un blanco terapéutico. Por ejemplo, la presencia de receptores hormonales en cáncer de mama implica que la paciente podrá ser tratada con terapia de ablación endocrina. En un futuro, el conocimiento del perfil molecular de un tumor permitirá la individualización de la terapia. La adopción de un tratamiento a medida de acuerdo a la composición molecular de los tumores



individuales implicará un cambio de paradigma, que ya está dando lugar a importantes mejoras terapéuticas

**h) Susceptibilidad al cáncer:** Están basados en la identificación de mutaciones germinales en genes involucrados en tumorigénesis. En su mayoría, se trata de genes supresores tumorales o genes que codifican para moléculas que mantienen la estabilidad del genoma. Algunos ejemplos son: el gen Rb (Cr 13), para predecir retinoblastoma; BRCA1 (Cr 17) y BRCA 2 (Cr 13) para cáncer de mama familiar.

### **Biobancos de muestras biológicas humanas**

La creación de Biobancos de muestras biológicas humanas ha permitido un enorme avance en el estudio de biomarcadores tumorales. Estos Biobancos son entidades que reciben, almacenan, procesan y/o entregan bioespecímenes, según corresponda, junto a datos personales e información asociada, recogidos y almacenados según normas de calidad preestablecidas. Un Biobanco debe contar con un equipo adecuado de profesionales, y debe comprometerse a mantener y preservar los registros para referencias futuras, y a continuar con la tarea en el tiempo. El Biobanco es una unidad funcional sin fines de lucro. Por el contrario, el biorrepositorio es una organización formal o informal de colección de materiales biológicos humanos, obtenido y almacenado durante el desarrollo de un proyecto específico de investigación.

De acuerdo a la Grupo *ad hoc* de Biobancos, del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la Nación de nuestro país, la definición de Biobanco comprende:

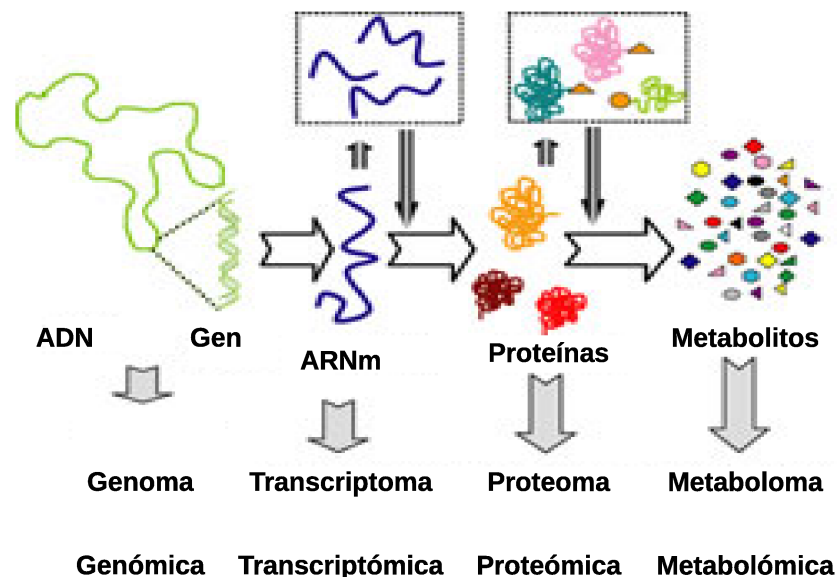
- Una organización responsable de su desarrollo, implementación, manutención y financiamiento.
- Una infraestructura adecuada.
- Archivos de toda la documentación pertinente.
- Los procedimientos y servicios para informar debidamente a las personas convocadas a participar como donantes en estudios científicos con el correspondiente consentimiento informado (CI).
- Los procedimientos para la colecta, el almacenamiento y el procesamiento de los bioespecímenes, para un mantenimiento y conservación adecuada.
- En el caso que aplique, los procedimientos para la obtención de productos celulares/moleculares derivados de los bioespecímenes.
- La eventual guarda de datos asociados a los bioespecímenes en condiciones que garanticen la seguridad y privacidad de los mismos.

- Los procedimientos apropiados para el acceso y disponibilidad de los especímenes y/o datos asociados.
- Los procedimientos para la cesión y el envío de los bioespecímenes y/o productos derivados.
- Un sistema de gestión de calidad con documentación, registros y procedimientos asociados, programas de mantenimiento y de bioseguridad.

La cesión de una muestra biológica al Biobanco es voluntaria y altruista, desinteresada y gratuita, requiriendo la firma por parte del donante de un CI. Este es un requisito *sine qua non* para el funcionamiento de un Biobanco.

### **Estudio de biomarcadores a gran escala**

La disponibilidad de una multitud de tecnologías “ómicas” desarrolladas en los últimos años para investigar el genoma (genómica), transcriptoma (transcriptómica), proteoma (proteómica) y metaboloma (metabolómica), entre otras, de los tumores y fluidos biológicos están posibilitando una mejor comprensión de las características moleculares subyacentes de los distintos cánceres (Figura 5). Estas tecnologías permiten el análisis de múltiples analitos al mismo tiempo.



**Figura 5: Biomoléculas y las técnicas “ómicas” que las estudian.**

La **genómica** se basa en el estudio de la dotación de genes de un organismo o un tejido en un momento dado. La técnica más utilizada es la secuenciación que permite identificar alteraciones genéticas presentes, por ejemplo, en el genoma de un tumor. La "secuenciación de segunda generación" promete la llegada de una nueva era en la genómica del cáncer. Se ha demostrado que la generación de plataformas de secuenciación masiva pueden identificar la totalidad de las alteraciones genéticas en cáncer incluyendo mutaciones puntuales, inserciones, deleciones, cambios en el número de copias y rearrreglos genómicos (41).

La **transcriptómica** estudia la dotación de mRNA de un organismo o un tejido en un momento dado, o sea, todos los genes que están siendo transcritos. La técnica más utilizada es el microarray que consta de una plataforma, un chip, que tiene unida sondas de ADN complementarias a los ARNm que se desea estudiar. Las muestras son procesadas para la extracción del ARN total, se marcan, se hibridizan y se escanean. El análisis, como con la mayoría de las "ómicas", requiere de un *software* especial.

Esta técnica permite descubrir los ARNm que están activos y los que no, en diferentes muestras de tejido, para reconocer aquellos que se expresan de manera aberrante, por ejemplo, en células tumorales (42). En los últimos años se desarrolló la técnica chip-seq (*Chromatin Immunoprecipitation* acoplada a secuenciación) que permite, no sólo identificar los ARNm que se expresan diferencialmente en distintas condiciones, sino que también los secuencia para identificar mutaciones.

La **proteómica** estudia la dotación de proteínas y péptidos de un organismo en un tiempo dado. Existen diferentes técnicas validadas para realizar un estudio proteómico en fluidos o lisados biológicos, como la espectrometría de masas y gel de electroforesis en dos dimensiones (2D-PAGE).

Esta última técnica permite separar a las proteínas utilizando dos metodologías lo que aporta mejor resolución. En primer lugar, las proteínas se hacen correr sin alterar su carga natural, mediante la aplicación de un voltaje y un gradiente de pH. De esta manera las proteínas se movilizan hasta llegar a una posición de equilibrio según su carga total, lo que permite su separación según su punto isoeléctrico. En segundo lugar, se agrega un buffer con un detergente, SDS, que permite cargar negativamente a las proteínas de manera de liberarse de la carga neta de cada proteína. Se aplica nuevamente un voltaje por lo que las proteínas se separan, a través de un gel, según su peso molecular (Figura 6). De esta manera, se obtiene un gel en el que las proteínas se han separado según dos propiedades: punto isoeléctrico y peso molecular. Si el gel se tiñe con algún colorante de proteínas como el Coomassie blue, se pueden identificar *spots* que representan proteínas pertenecientes a la muestra original. Esos *spots* se pueden comparar entre dos condiciones, como por ejemplo tejido tumoral y tejido normal, e identificar los que aparecen y

desaparecen en una u otra condición lo que permitiría, en un primer análisis, diferenciar entre las muestras según la dotación de *spots* de cada una. En un segundo análisis, la proteína localizada en un determinado spot diferencialmente expresada, se puede identificar mediante, por ejemplo, espectrometría de masas. En este sentido, Davalieva *et al.* identificaron 28 proteínas diferencialmente expresadas en muestras de tejido de tumor benigno o de cáncer de próstata, utilizando las técnicas de 2D-PAGE y espectrometría de masas (43).

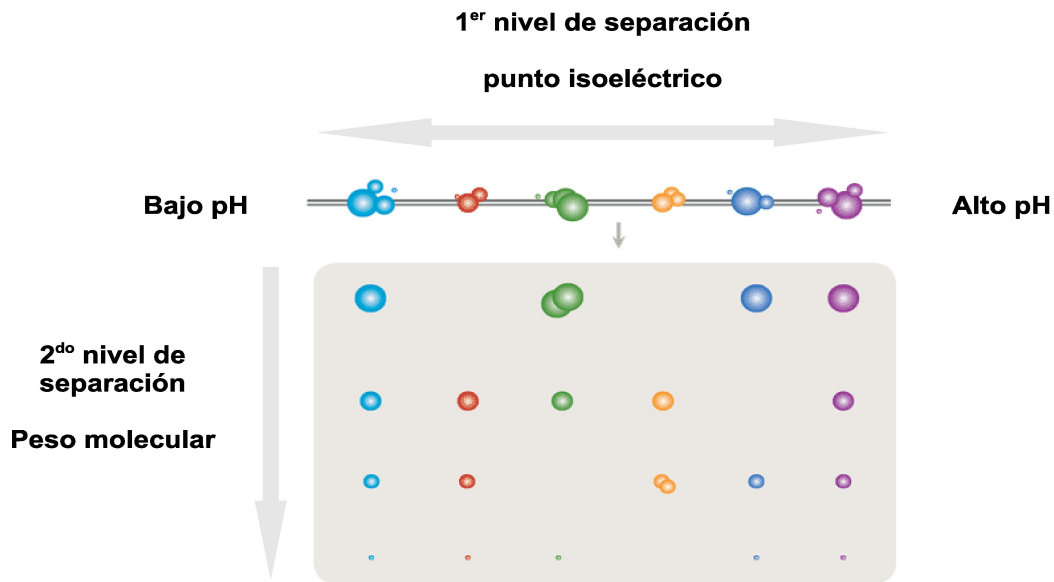


Figura 6: Esquema ilustrativo de la técnica 2D SDS-PAGE.

Otra técnica utilizada en proteómica para estudiar fluidos o lisados biológicos, pero que no está validada, es el microarray de proteínas o "*antibody array*". Esta técnica permite identificar múltiples proteínas al mismo tiempo en un mismo procedimiento. Al igual que para el chip de microarray para transcriptómica, se cuenta con una plataforma que posee anticuerpos que reconocen determinadas proteínas localizados en spots identificables. Al incubar la muestra biológica con el antibody array, cada proteína se unirá con su anticuerpo específico en su *spot* determinado. El sistema se revela incubando, en primer lugar, con un *pool* de anticuerpos primarios libres biotinilados, que reconocen cada uno a su proteína específica y, en un segundo paso, con estreptavidina conjugada a algún sistema de detección que puede ser un fluoróforo o una enzima, como HRP, el cual, en presencia de su sustrato específico, producirá luz. El sistema se revela con un método específico (detector de longitud de onda específico en el caso de que el anticuerpo secundario estuviese conjugado a un fluoróforo o una placa radiográfica en el caso de contar con

un anticuerpo secundario conjugado a HRP). Posteriormente se cuantifican los resultados (Figura 7) (44).

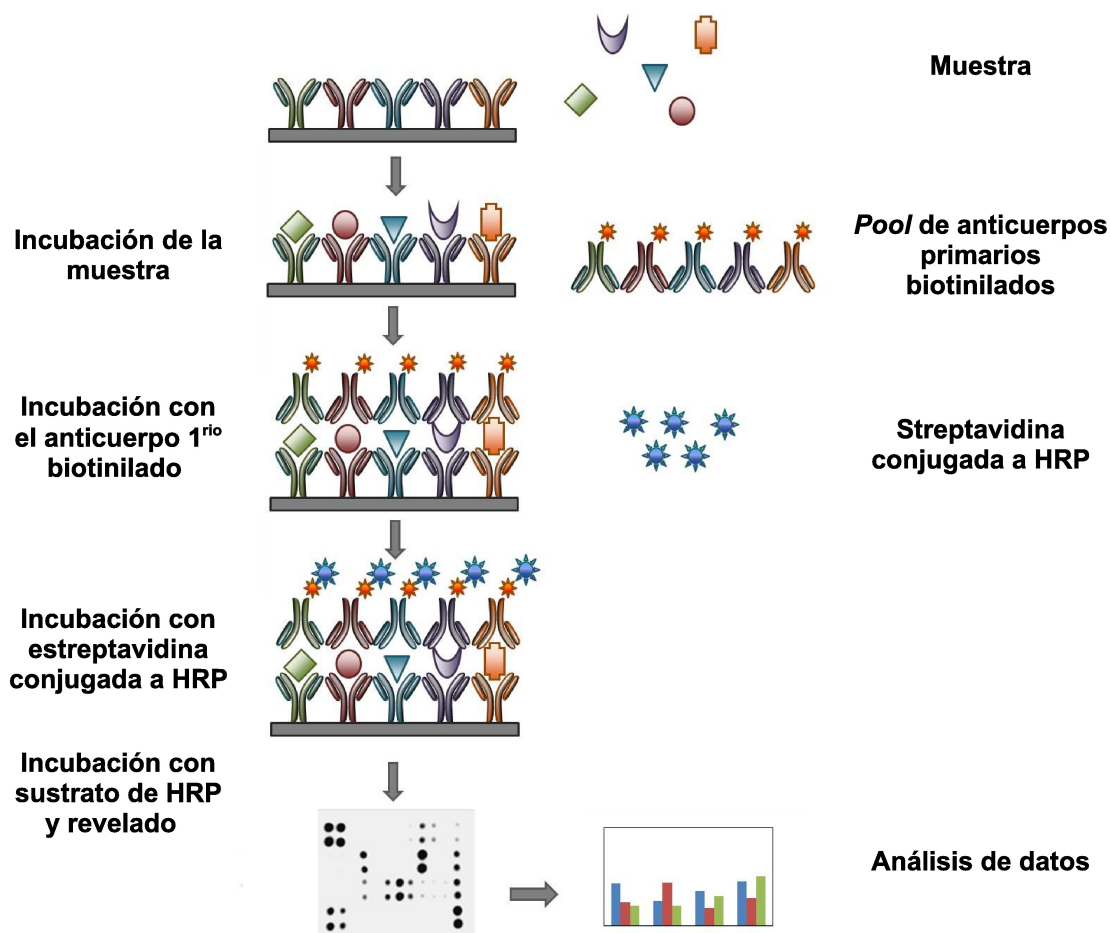


Figura 7: Esquema que representa el procedimiento necesario para realizar un microarray de proteínas.

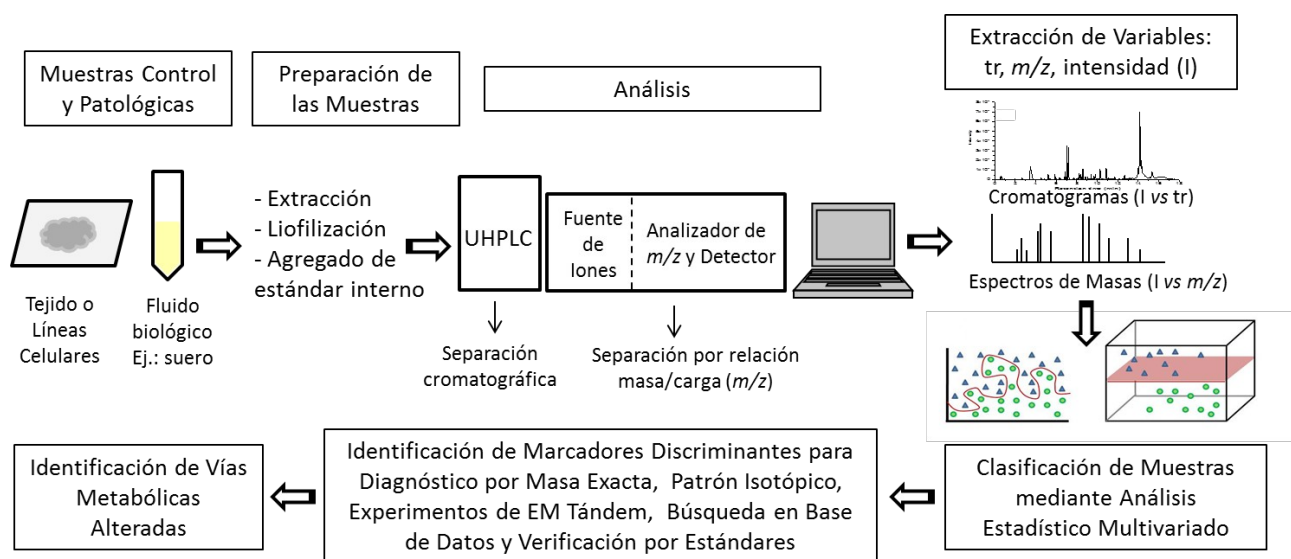
La **metabolómica** es un campo emergente de la investigación “ómica” especializado en el análisis global de metabolitos provenientes de organismos vivos (45). El metaboloma puede ser definido como la colección completa de moléculas pequeñas (masa molecular < 1500-2000 Da) que están presentes en un momento determinado (46,47). Ejemplos de estos compuestos químicos son péptidos, lípidos, amino ácidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, ácidos orgánicos, vitaminas, aditivos alimentarios, drogas, toxinas, contaminantes y otras sustancias que se ingieren, metabolizan, catabolizan o a los cuales los organismos están expuestos. Es decir, el metaboloma no está definido únicamente por la expresión génica sino también por el medio ambiente

(48) incluyendo la microflora bacteriana del tracto intestinal. Por lo tanto, existen metabolitos endógenos y exógenos.

La metabolómica ha resurgido en la última década, como una alternativa para la búsqueda de marcadores de enfermedades, debido al desarrollo tecnológico de plataformas analíticas capaces de analizar y detectar múltiples componentes en tejidos y biofluidos; y debido a la implementación de métodos estadísticos de análisis multivariado con capacidad de analizar grandes volúmenes de datos. La espectrometría de masas (EM) y la resonancia magnética nuclear (RMN) son plataformas analíticas de preferencia para la caracterización y el análisis no dirigido (*untargeted*) del metaboloma (49,50). La EM, en particular, es ampliamente utilizada debido a su alta sensibilidad, resolución y capacidad de identificar moléculas con alta exactitud, además de ser una técnica analítica robusta y reproducible que permite el análisis de un alto número de muestras biológicas en poco tiempo. No sólo es indispensable en la elucidación estructural de analitos, sino que también puede ser utilizada para identificar y cuantificar selectivamente un dado compuesto a partir de su masa molecular en una matriz compleja. En estudios de metabolómica la EM se utiliza generalmente acoplada a una técnica separativa como pueden ser la cromatografía o la electroforesis (51,52).

El análisis de los perfiles metabólicos mediante EM ha sido utilizado en los últimos años en la caracterización y detección de enfermedades en sus distintos grados de avance (53–57). En particular, técnicas basadas en el uso de EM han sido aplicadas a estudios de metabolómica en distintos tipos de cáncer (54,58–62). El acoplamiento de una técnica separativa como la cromatografía líquida previa al análisis de la relación masa/carga ( $m/z$ ) en un instrumento de alta resolución utilizando, por ejemplo, un analizador de cuadrupolo-tiempo-de-vuelo (LC-QTOF-MS); sumado a la capacidad del espectrómetro de masas de efectuar análisis en tándem (MS/MS o MS<sup>n</sup>) mediante la identificación de fragmentos de los iones precursores, se ha convertido en un pilar en el análisis de moléculas y drogas en muestras biológicas y en química clínica (63,64). El uso de cromatografía líquida de ultra *performance* (UPLC) acoplada a EM permite además obtener alta resolución en los picos cromatográficos y reducir el tiempo de análisis de muestras complejas en un factor 5 respecto de la tradicional cromatografía líquida de alta *performance* (HPLC) debido al menor tamaño de las partículas en las columnas (< 2µm) (60,64).

La Figura 8 sintetiza de manera esquemática las distintas etapas involucradas en el análisis de muestras complejas. El objetivo final es su clasificación de acuerdo a los distintos grados de progresión de la enfermedad y la identificación de biomarcadores asociados. Dependiendo de la masa del compuesto de interés, y de su facilidad para ionizarse, pueden analizarse compuestos en el rango de concentraciones de micromolar, alcanzándose en algunos casos, el nivel de nanomolar.



**Figura 8: Esquema de la metodología de trabajo a desarrollar para el análisis metabólico por UPLC-MS.**

## **BIOMARCADORES CON POSIBLE UTILIDAD CLÍNICA EN CCR**

### **a. Marcadores de diagnóstico**

Para la mayoría de las neoplasias renales, el diagnóstico se basa en la observación de la morfología celular mediante histología tradicional (cortes histológicos coloreados con hematoxilina/eosina). Sin embargo, la inmunohistoquímica es indispensable para subclasificar histológicamente variantes de los CCR, para diagnosticar las biopsias cuando el material es escaso, o para identificar metástasis en órganos distantes.

Las moléculas más estudiadas como posibles marcadores inmunohistoquímicos de valor diagnóstico son: la vimentina (marcador mesenquimático) y las citoqueratinas (CK) (proteínas del citoesqueleto celular; siendo la mayoría de los CCR CK18+, algunos CK7+ y todos CK20-). Otros posibles marcadores son: la enzima de superficie celular que disminuye la respuesta de las células a las hormonas peptídicas (CD10); el AcMo comercial dirigido contra una glicoproteína presente en el ribete en cepillo de las células normales del túbulo contorneado distal (RCC *marker*); CAIX; el receptor transmembrana (CD117); E-cadherina específica de riñón (isoforma de una molécula de adhesión que sólo se expresa en la cara basolateral de la membrana plasmática de las células de los túbulos contorneados distales y colectores); parvalbumina (proteína que regula la homeostasis citoplasmática de calcio); la enzima mitocondrial que media la oxidación de los ácidos grasos (AMACR); el regulador del ciclo celular y la adaptación al estrés (p63); los factores transcripcionales (PAX2 y PAX8) (65). En la Tabla II se lista la expresión de marcadores en los subtipos más prevalentes de los CCR.

<b>Tipo de CCR</b>	<b>Marcador +</b>	<b>Marcador -</b>
<b>Células claras</b>	<b>Vimentina - CAIX Queratinas AE1/AE3 CD10 - RCC marker</b>	<b>CD117 Cadherina específica de riñón Parvalbumina</b>
<b>Papilar (Tipo I)</b>	<b>Vimentina - CK7 Queratinas AE1/AE3 AMACR - RCC Marker</b>	<b>CD117 Cadherina específica de riñón Parvalbumina</b>
<b>Cromóforo</b>	<b>Cadherina específica de riñón Parvalbumina CD117 - CK7 Queratinas AE1/AE3</b>	<b>Vimentina CAIX AMACR</b>
<b>Urotelial</b>	<b>CK7 - p63 CK5/6 - CK20</b>	<b>RCC marker - CD10 PAX2 - PAX8</b>

Tabla II: Marcadores inmunohistoquímicos en algunos subtipos de CCR.



Como puede observarse en la Tabla II, los diferentes subtipos de CCR comparten la expresión positiva o negativa de marcadores inmunohistoquímicos; esto hace que sea necesario evaluar la expresión simultánea de varios antígenos para clasificar los distintos tipos tumorales con mayor precisión. Se ha recomendado incluir al menos el CD10, el RCC *marker* y los PAX2 y PAX8 en los paneles de diagnóstico para cáncer renal (65). Sin embargo, aún se requiere encontrar otros marcadores más específicos y sensibles.

El empleo de otras metodologías permitió identificar nuevas proteínas con niveles de expresión alterados, ya sea en el tejido tumoral o en los fluidos biológicos de los pacientes portadores de CCR. Algunas de ellas han sido validadas por diferentes grupos de trabajo. Como ejemplo, puede mencionarse el trabajo de Valera *et al.* quienes empleando electroforesis en geles bidimensionales (2D-PAGE), compararon la expresión proteica entre diferentes subtipos de CCR y con respecto al tejido renal normal. Entre las proteínas diferencialmente expresadas en los CCR, pudieron identificar a la *Heat shock protein 27* (Hsp 27) (66). Otros autores encontraron un aumento en los niveles de la Anexina IV y de la proteína amiloide A, tanto en el tejido tumoral como en el suero de pacientes con CCR (67,68).

Arsanius *et al.* describieron 33 miARN expresados diferencialmente en los CCRcc, aunque muchos de ellos están también desregulados en otros cánceres (69). Por otro lado, Youssef *et al.* desarrollaron un sistema de clasificación utilizando microarrays de miARN que permiten diferenciar los subtipos más comunes de CCR (CCRcc, papilar, cromóforo y oncocitoma). Además, concluyeron que la oncogénesis del CCRcc está más relacionada con el CCR papilar, mientras que la del CCR cromóforo se asocia más con el oncocitoma (70).

Unwin *et al.* encontraron, en tejido tumoral renal, un aumento de proteínas involucradas en distintos pasos de la vía glucolítica y una disminución en las reacciones gluconeogénicas en combinación con una disminución de varias de las enzimas mitocondriales (67). Perroud *et al.* demostraron que los cambios en la expresión de enzimas de la vía glucolítica reflejan el comportamiento tumoral y pueden tener valor pronóstico (71).

También, se están haciendo esfuerzos para integrar los análisis de niveles diferentes de cambios moleculares para permitir un mejor entendimiento de la patogénesis del CCR. Así, combinando genómica y transcriptómica se identificaron 71 genes expresados en regiones cromosómicas aberrantes y se observó, en regiones amplificadas, una predominancia de genes sobreexpresados y una tendencia al agrupamiento (*clustering*) (72).

Finalmente, otra herramienta invaluable para el estudio de la patogénesis del CCR es el análisis citogenético. Desde hace varios años, se conoce la presencia de alteraciones cromosómicas involucradas en el desarrollo del CCR. Entre ellas, se destaca la delección del brazo

corto del Cr 3 donde, entre otros, se pierde el gen VHL característico del CCRcc; la trisomía del brazo largo del Cr 3 y de los Cr 7, 12, 16, 17 y 20 en el CCR papilar y la monosomía de los Cr 1, 2, 6, 10, 13, 17 y 21 en el CCRcrb (73). Otros autores que han utilizado técnicas genético-moleculares para la clasificación de los CCR encontraron que las alteraciones cromosómicas en el CCRcc difieren significativamente de aquellas encontradas en el CCR cromóforo y que los genes que se encuentran sobre y subexpresados se localizan en áreas de ganancia y pérdida de cromosomas respectivamente (74).

#### **b. Marcadores de pronóstico**

En el CCR los factores de pronóstico clásicos incluyen características anatómicas (clasificación TNM y tamaño tumoral), histológicas (grado nuclear de Fuhrman y subtipos histológicos) y clínicas (síntomas y *Performance Status*). Más recientemente, se ha asociado a un mal pronóstico a aquellos pacientes que tienen tres o más de los siguientes indicadores: niveles de lactato deshidrogenasa mayores a 1,5 veces el límite normal, valores de hemoglobina menores al valor límite normal, niveles de calcio corregidos  $>10$  mg/dL (2,5 mmol/L), intervalo menor de 1 año desde el diagnóstico original y el comienzo de la terapia sistémica, *Performance Status* de Karnofsky  $\leq 70$  y la presencia de metástasis en dos o más sitios (75).

Desde hace varios años, se sabe que los cambios citogenéticos en el CCR pueden tener valor pronóstico. Así, por ejemplo la pérdida del brazo corto del Cr 9, se asocia con un mal pronóstico (76). Por otro lado, a través de un análisis molecular y mediante el uso de inmunohistoquímica en muestras de tejido tumoral se reportó como posibles factores de un mal pronóstico una baja expresión de CAIX (77) y una alta expresión de HIF1 $\alpha$ , p53, Survivina (proteína anti-apoptótica), VEGFR1 y KI67 (marcador de proliferación) (78), entre otros. En suero, los niveles aumentados de VEGF se asociarían también a una menor supervivencia.

Más recientemente, la identificación y potencial incorporación de perfiles de expresión molecular están optimizando el pronóstico. En 2010, Brannon *et al.*, empleando criterios moleculares, subclasificaron tumores CCRcc histológicamente similares en dos grupos con marcadas diferencias en el pronóstico del paciente (79). Más detalladamente, estos autores, empleando microarrays de expresión génica, pudieron identificar el subtipo de CCRcc tipo A (ccA) y el tipo B (ccB). Los resultados, validados en un segundo grupo de pacientes, determinaron que el subtipo ccA tiene una supervivencia mejor independientemente de otros parámetros clínicos. El mejor pronóstico del subgrupo ccA se asoció con la sobreexpresión de genes asociados a hipoxia, angiogénesis, metabolismo de ácidos grasos y de ácidos orgánicos, mientras que los tumores ccB

sobreexpresan un panel de genes que regulan el TEM, el ciclo celular y la reparación de heridas. En ambos grupos, se observó inactivación del gen VHL, pero el grupo ccB adquirió cambios genéticos adicionales, que suplementan los eventos de la vía VHL y contribuyen a un fenotipo más agresivo.

Entre otros muchos trabajos publicados, deben mencionarse, por un lado, los trabajos de Moch *et al.*, quienes identificaron 89 genes expresados en forma diferencial en los CCR de los cuales el gen que codifica para vimentina es un marcador de mal pronóstico y, por el otro, el trabajo de Boer *et al.*, quienes encontraron una firma de expresión génica que permite diferenciar los tumores tempranos de aquellos de estadios avanzados (80,81). De un modo interesante Kim *et al.*, usando un análisis de microarray de tejidos, construyeron un modelo de pronóstico combinando criterios clínicos y moleculares para determinar la supervivencia, más preciso que los parámetros clínicos estándares (82).

### **c. Marcadores predictivos y de respuesta a los tratamientos instaurados**

El “*gold estándar*” de la terapia del CCR, en el caso de que el tumor esté confinado al riñón, es la cirugía. Sin embargo, como se mencionó previamente, un gran número de pacientes son diagnosticados en estadios avanzados cuando ya presentan metástasis lo que, sumado a que los tumores CCR son altamente resistentes a los agentes quimioterápicos, dificulta el tratamiento. Hoy en día, se cuenta con muy pocos marcadores que puedan guiar al clínico en la elección de la terapia para cada paciente.

Si bien la inmunoterapia basada en la IL-2 e IF $\alpha$ , sola o en combinación, indujo a una regresión en un porcentaje pequeño de pacientes, no demostró beneficio en términos de SVG. Además, la terapia con estas citoquinas conlleva una toxicidad que limita su uso a sólo un porcentaje selecto de pacientes. En pacientes con CCRcc, la respuesta al IL-2 se asoció con la presencia de estructuras alveolares en más del 50% de la muestra histológica y con la ausencia de características papilares o granulares (83). Por otro lado, el hallazgo de niveles aumentados de CAIX se ha asociado a un pronóstico más favorable y con una mayor probabilidad de respuesta al IL-2 (77,84).

El mayor entendimiento de la biología del CCR ha llevado al desarrollo de terapias dirigidas y ha abierto nuevas posibilidades terapéuticas (10,85,86). Un ejemplo de ello es el empleo de drogas que interfieren con la señalización aberrante de las vías VEGF/VEGFR y mTOR, en particular en el caso del CCRcc, tumor altamente vascularizado. Los agentes disponibles incluyen inhibidores de receptores de tirosina-quinasa (sorafenib, sunitinib, pazopanib, llamados también de primera generación) y de mTOR (everolimus, temsirolimus), así como anticuerpos anti-VEGF

(bevacizumab y ramucirumab). También, están en estudio otros inhibidores de tirosina-quinasa, los de segunda generación como el axitinib y tivozanib y los de tercera generación como dovitinib, regorafenib y cediranib. Por último, también se ha desarrollado una droga para refrenar la inhibición del sistema inmune generada por el tumor, nivolumab (87).

El bevacizumab es un anticuerpo monoclonal que previene la interacción del ligando VEGF con su receptor VEGFR, pero su eficacia en términos de SVG no ha sido conclusiva. Por otro lado, el sunitinib, un inhibidor de receptores tipo tirosina-quinasa que incluyen al VEGFR y al PDGFR, y el sorafenib, un inhibidor multiquinasa capaz de prevenir la activación del VEGFR, están siendo evaluados en relación con el beneficio que tienen en la SVG. Más recientemente, nuevas esperanzas se han abierto con el uso del temsirolimus, inhibidor específico de mTOR, cuyos resultados parecen prolongar la SVG en pacientes metastásicos con pronóstico pobre.

El descubrimiento de biomarcadores predictivos de respuesta o de toxicidad a la terapia instaurada ayuda al médico a tomar decisiones sobre el riesgo o beneficio de una determinada terapia. Se determinó que en pacientes con CCRcc metastásico tratados con el antiangiogénico sunitinib, determinados polimorfismos de nucleótido único (SNP) en VEGF y VEGFR están asociados a una mejor supervivencia global (88). (SNP se define como el cambio en una única base, en regiones codificantes o no codificantes de la secuencia de ADN, que se produce en una proporción significativa >1% de una población numerosa). Por otro lado, biomarcadores fisiológicos como la hipertensión y el índice de masa corporal también están siendo estudiados como marcadores de supervivencia en el contexto de los tratamientos anti-VEGF/VEGFR (89).

Se están haciendo esfuerzos para aumentar la eficacia combinando dos o más agentes que empleen algunos de los siguientes enfoques básicos: “Inhibición vertical”, que describe combinaciones de terapias que tienen como blancos moléculas que se encuentran en un mismo camino de señalización lineal, o “Inhibición lateral”, que implica la inhibición de dos caminos que no se superponen. Un ejemplo de inhibición vertical es el bloqueo de la vía de señalización VEGF/VEGFR mediante el empleo de bevacizumab con sorafenib, lo que podría aumentar la respuesta, pero a expensas de una mayor toxicidad. Un ejemplo de inhibición lateral es la combinación de agentes que bloquean la vía VEGF/VEGFR y de inhibidores de mTOR, aunque la combinación de sunitinib con temsirolimus resultó muy tóxica. Otras combinaciones están en estudio y con el tiempo se demostrará si hay una mejora en la respuesta asociada a una mayor supervivencia libre de progresión o a una mayor supervivencia global.

La reprogramación metabólica de la célula tumoral puede inducir a efectos anti-neoplásicos. De acuerdo con esto, en los últimos años, se ha indicado que, el uso de drogas genéricas que interfieren con el metabolismo de la glucosa y del colesterol, está asociado a una reducción en el

riesgo de determinados cánceres. En particular, se ha prestado mucha atención a las estatinas y a la metformina. La metformina es un hipoglucemiante oral ampliamente utilizado en el tratamiento de la diabetes tipo II. Su efecto anti-diabético se debe principalmente a la reducción en la producción de la glucosa hepática y al aumento de la sensibilidad a la insulina aumentada, vía la activación de AMPK, que es un regulador negativo de mTOR. Esto trae como consecuencia el bloqueo de procesos que consumen energía y la activación de procesos que producen energía. Actualmente, se está estudiando si la metformina puede inhibir los efectos metabólicos inducidos por la activación constitutiva del mTOR en los CCR y si puede tener efectos anti-proliferativos.

En la actualidad no se cuenta con biomarcadores predictivos de estas terapias aprobados para su uso en la clínica.

#### **d. Marcadores metabólicos**

En los últimos años, se ha reportado en la literatura algunos estudios en los que la metabolómica ha sido implementada para ampliar el conocimiento acerca de las vías metabólicas alteradas durante el cáncer de riñón con el fin de descubrir nuevos marcadores de la enfermedad. A pesar de que la mayoría de los estudios han sido efectuados en orina (90–94) con la principal contribución del Dr. R. H. Weiss y sus colaboradores, este grupo ha demostrado recientemente mediante un estudio efectuado en ratones, que el suero es un mejor intermediario de los cambios que se producen en los tejidos tumorales (95). Algunos de los metabolitos, cuyas vías metabólicas han sido propuestas como alteradas durante la evolución del CCR mediante el análisis de orina, son las acilcarnitinas (91) y el triptofano (93,95) el cual también ha sido evidenciado en un reciente estudio efectuado en suero (96). Los trabajos descritos en literatura hasta el momento son generadores de nuevos interrogantes y promueven la necesidad de efectuar nuevos estudios en suero para validar las vías propuestas, descubrir otras vías metabólicas alteradas por la enfermedad y encontrar paneles de marcadores que sirvan en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento.

## **MOLÉCULAS QUE SE ESTUDIARON EN ESTE TRABAJO PARA EVALUAR SU POTENCIAL USO COMO BIOMARCADOR EN CCRcc**

### **TRANSPORTADOR DE GLUCOSA DE TIPO 1 (GLUT1)**

Los transportadores de glucosa, GLUTs, permiten el pasaje de glucosa, a través de la membrana en contra de su gradiente de concentración pero sin gasto de energía. Se han identificado 13 miembros pertenecientes a esta familia. Los genes pertenecen a la familia de *Solute carrier 2A* (SLC2A) (97,98). Se los ha clasificado en 3 clases: la clase I contiene a los conocidos y muy caracterizados GLUT1-4, la clase II comprende al transportador de fructosa GLUT5 y a GLUT7, GLUT9 y GLUT 11 y, por último, la clase III está compuesta por GLUT6, GLUT8, GLUT10, GLUT12, y el transportador H<sup>+</sup>/myo-inositol HMIT.

En la secuencia aminoacídica de los GLUTs, se han encontrado 12 dominios de  $\alpha$ -hélice hidrofóbicos lo que indica que estas proteínas son transportadores de 12 pasos transmembrana con los extremos NH<sub>2</sub> y COOH localizados en el citoplasma (99). Existe un alto grado de homología entre los GLUTs de los pasos transmembrana y son los extremos NH<sub>2</sub> y COOH los que presentan mayor variabilidad.

Cada uno de los transportadores de glucosa posee diferente afinidad por la glucosa y otras hexosas como la fructosa. GLUT1, GLUT3, y GLUT4 poseen alta afinidad por la glucosa permitiendo una alta tasa de transporte bajo condiciones fisiológicas normales (100). GLUT1 está presente en, niveles variables, en muchos tejidos y es responsable de la incorporación de glucosa basal. Exhibe su mayor expresión en eritrocitos y en células endoteliales del cerebro (99). GLUT4, en células de músculo esquelético y adipocitos, está casi completamente secuestrado en vesículas intracelulares en estado basal, pero es traslocado a la membrana plasmática en presencia de insulina (101). GLUT2 se expresa mayoritariamente en las células- $\beta$  pancreáticas, hígado y en el intestino delgado. Posee un Km alto hacia la glucosa por lo que el transporte depende ampliamente de los cambios de concentración del azúcar como ocurre luego de la ingesta de alimento (102). Por el contrario, GLUT5 tiene poca o nula afinidad por la glucosa y, en cambio, posee una alta afinidad por la fructosa y es considerada la responsable de la mayor incorporación de fructosa en el intestino delgado (103). La fructosa, también es transportada por GLUT2, aunque con mucha menor afinidad que por la glucosa (104). GLUT3 también posee alta afinidad por glucosa y se expresa en tejidos con elevados requerimientos del azúcar como el cerebro (105).

La afinidad hacia la glucosa o los parámetros cinéticos del resto de los transportadores son menos conocidos. Estudios iniciales demostraron que GLUT6, GLUT8, GLUT10 y GLUT11 son capaces de facilitar la incorporación de glucosa en oocitos de *Xenopus laevis* (GLUT8 y GLUT10) o células COS-7 transfectadas (GLUT6, GLUT8 y GLUT11) (106–108).

En riñón de rata normal se ha descrito la expresión de GLUT1, GLUT3 y GLUT4 tanto en glomérulos como en túbulos renales y de GLUT5 en túbulos proximales (109,110).

La sobreexpresión de GLUT1 ha sido ampliamente estudiada en cáncer y se ha descrito su expresión en muchos tipos de cáncer como hepático, renal, colorectal, endometrial, cervical, de páncreas, mama, esófago, cerebro, pulmón, cutáneo y ovario (111–120).

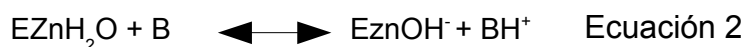
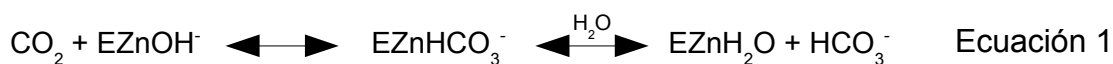
Como se mencionó anteriormente, la expresión de GLUT1 se encuentra bajo regulación del complejo HIF $\alpha$ /HIF1 $\beta$  y, por lo tanto, su expresión aumenta en condiciones de hipoxia y en tumores que poseen alteraciones en esa vía como CCRcc (121). En algunos estudios se observó que la expresión de GLUT1 está aumentada sólo en tumores CCRcc y no en tejido no tumoral o en otros tipos histológicos de CCR (122). También se ha estudiado su asociación con los parámetros clínico-patológicos en los pacientes con CCRcc (112,123). Si bien no se han encontrado asociaciones significativas, es importante continuar analizando a esta molécula como biomarcador ya que se ha observado que está relacionada con peor pronóstico en otros tipos tumorales como carcinoma adrenocortical, de células escamosas y de mama (124–126). Incluso se ha reportado la existencia de una droga capaz de inhibir el crecimiento de las células CCRcc por unión a GLUT1 e inhibir de la incorporación de glucosa, lo que convierte a GLUT1 en un potencial biomarcador predictivo (127).

### **ANHIDRASA CARBÓNICA IX (CAIX)**

Las Anhidrasas Carbónicas (CAs) son metaloenzimas ubicuas presentes tanto en procariotas como en eucariotas codificadas por seis familias de genes no relacionados evolutivamente. Las  $\beta$ -CAs,  $\gamma$ -CAs,  $\delta$ -CAs  $\zeta$ -CAs y las recientemente identificadas  $\eta$ -CAs se encuentran en organismos que van desde bacterias, hasta archeas, plantas y protistas. Las  $\alpha$ -CAs son las están presentes en vertebrados pero también en otros organismos como algas y bacterias (128,129).

Para ejecutar su actividad catalítica, las CAs necesitan la presencia de un metal en su sitio catalítico, que generalmente es  $Zn^{2+}$  en combinación con tres residuos que pueden ser tres histidinas, cisteínas o tres glutaminas dependiendo de la familia a la que pertenezcan

El mecanismo catalítico de la reacción de hidratación de  $CO_2$ , ampliamente estudiado en las clases  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , está compuesto por dos pasos (130,131). En el primer paso, un  $OH^-$  unido al ion Zinc, es sustituido por una molécula de agua (ecuación 1). El segundo paso, limitante de la reacción, consiste en la regeneración de la especie reactiva de la enzima, el  $OH^-$  unido a Zinc, por transferencia de un protón desde la molécula de agua unida al Zinc hacia el buffer externo (ecuación 2). Como se mencionó, este proceso es generalmente asistido por un residuo de la enzima que, en la mayoría de las isoformas humanas, es una histidina (132,133).



\*B: Buffer

Se han identificado 16 miembros dentro de la familia  $\alpha$ -CAs que poseen diversa expresión, propiedades cinéticas y sensibilidad a inhibidores y que son tejido y localización subcelular específicas (134). Ocho de ellas, son citosólicas (CAI, CAII, CAIII, CAVII, CAVIII, CAX, CAXI y CAXIII), dos se encuentran en la matriz mitocondrial (CAVA y CAVB), una es de secreción (CAVI), dos son proteínas ancladas a fosfatidilinositol (GPI) (CAIV y CA XV) y tres son proteínas transmembrana (CAIX, CAXII y CAXIV) (134). Las CAs transmembrana catalizan la reacción de hidratación del  $\text{CO}_2$  en el espacio extracelular.

Se sabe que en el riñón se expresan dos CAs, CAII responsable de cerca del 95% de la actividad de CAs (135), y CAIV, del 5%. Ambas se encuentran en humanos y están ausentes en roedores (136,137). Últimamente, también se ha descrito la expresión de CAXII en el tejido renal (138,139).

CAIX y CAXII se expresan, mayoritariamente, en tejido tumoral (140). CAIX despertó mayor interés por su expresión normal limitada (141,142) y su aparente rol en proliferación celular y migración (143,144), adhesión celular (145), tumorigénesis (146) y control del pH (147–150).

La transcripción de CAIX está regulada por la dupla HIF1 $\alpha$ /HIF1 $\beta$ . Posee un dominio transmembrana y una cola intracitoplasmática (151–153). El dominio extracelular de la enzima está compuesto por el sitio catalítico y un dominio similar a proteoglicano. El átomo de Zinc se encuentra unido al sitio catalítico (Figura 9).



**Figura 9: Estructura de la enzima Anhidrasa Carbónica IX. IC: cola intracitoplasmática, TM: dominio transmembrana, SC: sitio catalítico, PG: dominio similar a proteoglicano, PS: péptido señal.**

CAIX se expresa como una proteína de 49,7 kDa pero es truncada durante su procesamiento postraducciona (154). La proteína final posee al extremo  $\text{NH}_2$  con el dominio similar



a proteoglicano, el sitio catalítico, el dominio transmembrana y el extremo COOH. En la membrana plasmática, CAIX forma oligómeros unidos por puentes disulfuro (155,156).

El dominio extracelular se libera al medio de cultivo de células CCRcc pero también *in vivo*, en fluidos biológicos como sangre y orina de pacientes portadores del tumor (157). Esta porción liberada, se denomina CAIXs (CAIX sérica) (158) y está regulada por la presencia de metaloproteasas.

CAIX se expresa en el 94-97% de los CCRcc (77,159), es menos frecuente en CCR papilar y no se expresa en tejido renal normal o en CCR cromóforo (160). Si bien se han llevado a cabo algunos estudios para dilucidar el valor pronóstico, diagnóstico y predictivo de la enzima CAIX en suero y en tejido, es necesario un mayor número de investigaciones para confirmar la eficacia de esta molécula como biomarcador en CCRcc.

### **FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO 21 (FGF21)**

La familia del Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF) humano está compuesta de 22 polipéptidos estructuralmente relacionados, aunque FGF15 solo ha sido descrito en ratón y no en humanos (161). Los genes FGF pueden ser divididos en 3 grandes grupos, los intracelulares (FGF11/12/13/14), los endocrinos (FGF15/19/21/23) y los paracrinicos que incluye al resto de los FGF (162,163).

En los últimos años se han caracterizado ampliamente los FGF endocrinos. Estos son secretados a circulación donde son estables por lo que son capaces de cumplir su función endocrina (164). Otra característica común entre los FGF endocrinos es el requerimiento de  $\alpha$ -Klotho (KL) y o  $\beta$ -Klotho (KLB) dos proteínas de membrana con distribución tisular restringida (165) para ejercer su acción biológica.

FGF21 es una molécula con una regulación muy compleja puesto que depende del estado nutricional, como ayuno u obesidad, y de las hormonas que regula, como insulina y glucagón. FGF21 media una comunicación cruzada entre diferentes órganos para regular los niveles de glucosa, la disponibilidad energética y el metabolismo de lípidos (166,167). En línea general, FGF21 se sintetiza en hepatocitos, es liberada a la circulación y llega a sus células blanco, los adipocitos maduros, a los cuales induce a incorporar más glucosa por inducción de GLUT1 y de manera independiente de la insulina, y a acumularla como triglicéridos (168–171).

La señalización de FGF21 requiere de la unión al receptor tirosina-quinasa de FGF (FGFR) y al cofactor, KLB que se localizan, entre otros, en los adipocitos que forman parte del tejido adiposo blanco y, por lo tanto, le confiere especificidad a sus órganos blanco.

También, estudios del sistema FGF21-FGFR-KLB indicaron que FGF21 es una hepatoquina que responde frente a condiciones de estrés (165) y que se activa en presencia de daño o de alguna patología hepática que influya sobre sus funciones metabólicas normales. El eje endocrino que involucra al FGF21 hepático y al complejo FGFR-KLB en los adipocitos maduros es una vía de respuesta a estrés que garantiza una corrección de niveles aberrantes de glucemia, lípidos y un consecuente balance energético en condiciones de estrés inducidas por patologías como obesidad, diabetes, hígado graso, transformación maligna y daños producidos por toxinas e infecciones (172,173).

Poco se sabe sobre el rol de FGF21 en cáncer y menos aún si su expresión podría utilizarse como biomarcador de esta enfermedad. Recientemente, Luo *et al.* han determinado, empleando un modelo murino, que la sobreexpresión de TGF $\alpha$  en células epiteliales de mama en combinación con una deficiencia genética de FGFR4, redujo la incidencia de cáncer de mama, retrasó la progresión tumoral y mejoró la supervivencia del individuo atribuyéndole esas respuestas, al aumento de expresión de FGF21 debido a la ausencia de TGF $\alpha$  (174). A su vez, Yang *et al.* han reportado que la expresión de FGF21 en el hígado del ratón es inducida como respuesta a la hepatocarcinogénesis química y genéticamente inducida (175).

Algunos trabajos indican que la concentración de FGF21 podría ser medida en circulación. Se encontraron niveles elevados de FGF21 en pacientes con alto índice de masa corporal, diabetes mellitus 2, síndrome metabólico, enfermedad coronaria, disfunción renal crónica y aguda, hepatitis y cirrosis (176–178). También se observó que FGF21 estaba aumentada en pacientes con cáncer de hígado (175).

## **SIRTUINA 6 (SIRT6)**

Las sirtuínas son enzimas de mamíferos pertenecientes a una familia muy conservada de desacetilasas de histonas o ADP transferasas dependientes de NAD<sup>+</sup> que se clasifican en 7 isoformas (SIRT1-7) (179). Son homólogas de las Sir2 (*Silent Information Regulator 2*), encontradas en *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila* y *C. elegans*. Experimentos iniciales en estos organismos demostraron que la sobreexpresión de Sir2 aumenta la expectativa de vida, mientras que su silenciamiento la acorta (180,181).

Sirtuina 1, la más estudiada y caracterizada de las Sirtuinas, es la que comparte mayor homología con Sir2. Sin embargo, la sobreexpresión de Sirtuina 1 no genera un aumento en la expectativa de vida, sino que confiere protección contra patologías relacionadas con la edad como la hipertrofia cardíaca y el Alzheimer (182,183). Sirtuina 1 también está involucrada en la reparación del ADN y en el mantenimiento de la estabilidad genómica. Se sabe que esta enzima puede

desacetilar factores involucrados en la reparación del ADN (184). Además, se ha demostrado que Sirtuina 1 es reclutada a sitios de ruptura del ADN luego de la exposición a un daño oxidativo (185).

El rol que desempeñan el resto de las Sirtuínas es menos conocido. Sirtuina 2 es una desacetilasa de tubulina y se ha postulado que podría actuar como punto de control durante la mitosis (186). Las Sirtuinas 3, 4 y 5 se localizan en la mitocondria donde regulan la síntesis de Acetil-CoA, la oxidación de ácidos grasos y la secreción de insulina en las células  $\beta$  pancreáticas (187–189). Sirtuina 7 es la menos estudiada y se ha asociado con la activación de la transcripción por ARN polimerasa I (190).

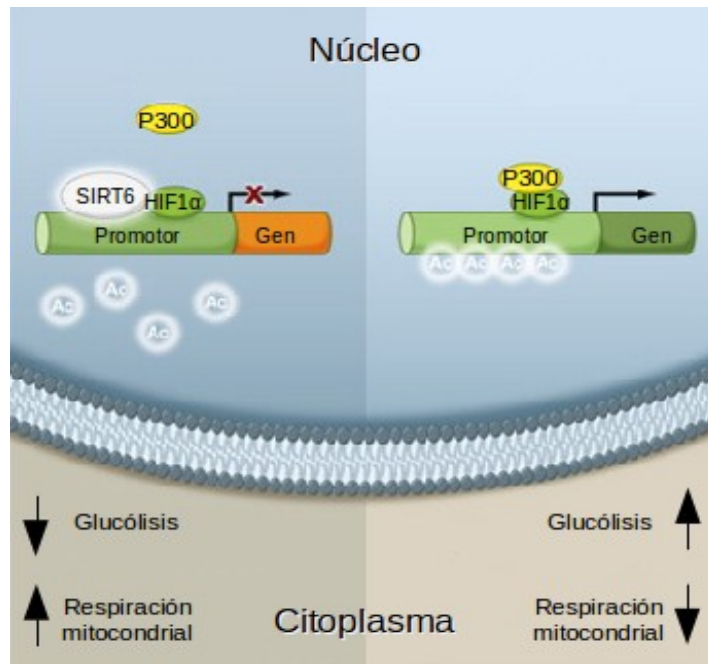
Sirtuina 6 (SIRT6) es una proteína involucrada en múltiples procesos celulares que incluyen la estabilización de telómeros, la coordinación de la reparación de la ruptura doble cadena del ADN y la supresión de la hiperactividad de NF- $\kappa$ B (191–194). También está involucrada en la reparación del ADN simple cadena (195). Sus blancos principales de desacetilación son dos residuos lisina de la histona H3: H3K9 y H3K56.

El primer indicio de que SIRT6 podría estar involucrada en el metabolismo de la glucosa provino de la observación del fenotipo de los ratones KO para esta proteína. A pesar de que lucen normales al nacer, estos ratones desarrollan rápidamente gran variedad de condiciones degenerativas que incluyen pérdida completa de la grasa subcutánea, linfopenia y osteopenia. El fenotipo más llamativo es el desarrollo de hipoglucemia aguda que finaliza con la muerte del ratón al mes del nacimiento. Esta hipoglucemia no está relacionada con una hiperinsulinemia sino más bien con un incremento en la incorporación de glucosa en las células de músculo esquelético y de grasa parda (195). Esta mayor incorporación de glucosa pudo reproducirse en células stem de ratón y fibroblastos de embrión de ratón KO para Sirt6 y fue asociado a la sobreexpresión del transportador de glucosa GLUT1 (196).

Zhong *et al.* demostraron que las células deficientes en SIRT6 sufren un cambio metabólico que lleva a una glucólisis láctica, incrementando la incorporación de glucosa y la producción de lactato y disminuyendo el consumo de oxígeno y la producción de ATP (196). Este efecto biológico podría asociarse al aumento en la expresión de diversas moléculas metabólicas como LDH, triosa fosfato hidrogenasa, fosfofrutoquinasa y, como se mencionó anteriormente, GLUT1. También, las enzimas Piruvato Deshidrogenasa Quinasa 1 y 4 (PDHK1 y PDHK4), inhibidoras de Piruvato Deshidrogenasa (PDH), presentan mayor expresión. Como resultado, se estimula la síntesis de lactato y se disminuye la disponibilidad de Acetil CoA, lo que inhibe el ciclo de Krebs (197).

También, Zhong *et al.* demostraron que bajo condiciones nutricionales normales, SIRT6 parecería cumplir función como co- represor de la actividad transcripcional de HIF1 $\alpha$ , desacetilando la histona H3K9 en los elementos respondedores a hipoxia (HRE). Incluso, la ARN polimerasa II se

posiciona en los promotores reprimidos por SIRT6 pero permanece inactiva. Es importante aclarar que, si bien HIF1 $\alpha$  es degradada en condiciones de normoxia, unas pocas moléculas escapan a la degradación y se localizan en la región HRE de sus promotores blanco. Bajo condiciones de estrés, SIRT6 es inactivada y los HRE son acetilados en la histona H3K9 activando la transcripción de los genes blanco de HIF1 $\alpha$ . Esto lleva a un aumento de la glucólisis en desmedro del ciclo de Krebs y de la fosforilación oxidativa reduciendo la respiración mitocondrial (196). También, HIF1 $\alpha$  depende del reclutamiento de P300, acetiltransferasa de histonas (198,199) (Figura 10). En este contexto, SIRT6 compite con P300 para unirse a HIF1 $\alpha$  y co-reprimirla (Figura 10).



**Figura 10: Modelo que representa la vía de señalización de SIRT6.**

En relación a la patología oncológica, hay estudios que indican que la expresión de SIRT6 está disminuida en algunos cánceres, como páncreas y colon, avalando la idea de que esta molécula podría ser considerada un supresor tumoral que actúa regulando el metabolismo de la célula neoplásica (200). No hay información disponible sobre el rol de SIRT6 en carcinoma renal.

## HIPÓTESIS

El análisis de la expresión de moléculas relacionadas con el proceso angiogénico y la desregulación metabólica, tanto a nivel tisular como a nivel sérico, permitirá encontrar biomarcadores de utilidad clínica para el diagnóstico y/o pronóstico de pacientes con Carcinoma Celular Renal de células claras (CCRcc).

El CCRcc, al igual que otros tumores, expresa múltiples moléculas como resultado de su crecimiento, metabolismo, reacción frente a la falta de oxígeno y nutrientes, evasión de sistema inmune, etc. que podrían dar abundante información sobre la evolución del mismo. Estas moléculas pueden ser evaluadas a nivel tisular, pero también a nivel sérico ya que muchas de ellas son liberadas al torrente sanguíneo. El suero es, todavía, una fuente muy poco explorada en la búsqueda de biomarcadores tumorales y que brinda una herramienta poco invasiva y capaz de ser evaluada en distintos momentos de la enfermedad.

Además, la detección de un panel de biomarcadores diagnósticos en CCRcc permitirá la detección más temprana de la enfermedad y un abordaje terapéutico precoz, cuando el paciente tiene más posibilidades de curación, impactando directamente en el manejo clínico del paciente. Los pacientes detectados en estadios tempranos tienen altas posibilidades de curación con tratamientos quirúrgicos, mientras que los pacientes avanzados son tratados, en su mayoría, con terapias dirigidas, no siempre exitosas, y con alto grado de toxicidad. La detección temprana limitaría el uso de estos tratamientos que impactan negativamente en la calidad de vida del paciente, así como también evitaría los elevados costos que afectan al sector socioeconómico.

De forma similar, la detección de biomarcadores pronósticos, permitirá adelantarse a la posible evolución que tendrá la enfermedad, habilitando un tratamiento agresivo precoz en el caso de pacientes con mal pronóstico y/ o un seguimiento más controlado.

Además, los conocimientos aportados permitirán un mayor entendimiento de las bases moleculares y metabólicas del CCRcc, lo que aumentará, a largo plazo, las posibilidades de modificar biológicamente el curso natural de la enfermedad.

En resumen, encontrar biomarcadores a nivel tisular y/o sérico mejorará el diagnóstico y seguimiento del paciente con Carcinoma Celular Renal de células claras, y tendrá un impacto positivo en la supervivencia del paciente.

## OBJETIVOS

### **OBJETIVO GENERAL**

**A)** Estudiar el valor diagnóstico y pronóstico de moléculas asociadas al proceso angiogénico y la desregulación metabólica tanto a nivel tisular como sérico en pacientes con Carcinoma Celular Renal de células claras (CCRcc).

**B)** Estudiar el efecto del silenciamiento de SIRT6 en células CCRcc.

### **A) OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Teniendo como modelo de estudio el CCRcc se propone:

**1.** A nivel tisular, mediante la técnica de inmunohistoquímica.

**1.1** Estudiar la expresión de GLUT1 y de CAIX, cuyas expresiones se sabe que están reguladas por HIF $\alpha$ , tanto a nivel de membrana como de citoplasma.

**1.2** Analizar la asociación de la expresión de GLUT1 y CAIX con los parámetros clínico-patológicos y la supervivencia de los pacientes.

**1.3** Determinar el valor de estas moléculas como biomarcador pronóstico independiente.

**2.** A nivel sérico.

**2.1** Cuantificar los niveles de expresión de de moléculas individuales, empleando la técnica de ELISA. En particular:

**2.1.a** Estudiar la concentración de la enzima CAIX.

**2.1.b** Cuantificar el nivel de FGF21, molécula relacionada con la disponibilidad de glucosa y ácidos grasos circulante, puesto que los tumores CCRcc poseen una clara desregulación en el almacenamiento de lípidos.

**2.1.c** Analizar la asociación de la expresión de CAIX y FGF21 a nivel sérico con los parámetros clínico-patológicos y la supervivencia de los pacientes con carcinoma renal.

**2.1.d** Determinar el valor de estas moléculas como biomarcadores de diagnóstico de CCRcc, comparando su expresión con la de individuos sanos o individuos con otras patologías.

**2.1.e** Determinar el valor de estas moléculas como biomarcador pronóstico independiente.

**2.2** Analizar la expresión de paneles de biomoléculas. En particular:

**2.2.a** Evaluar la expresión de múltiples moléculas relacionadas con el proceso angiogénico, mediante la técnica de microarray de proteínas, teniendo en cuenta las propiedades altamente angiogénicas de los tumores CCRcc y comparar su expresión con la obtenida en individuos sanos.

**2.2.b** Realizar un estudio metabolómico preliminar teniendo en cuenta que CCRcc es considerada un enfermedad metabólica.

## **B) OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Sabiendo, por resultados previos de nuestro grupo de investigación, que las líneas celulares de CCRcc, 786-O y Caki-1 expresan SIRT6.

1. Silenciar, por transducción, la expresión de la proteína SIRT6, molécula reguladora de la actividad de HIF1 $\alpha$  y por lo tanto del metabolismo celular, en estas líneas celulares.
2. Evaluar, mediante WB, la expresión de moléculas relacionadas con el metabolismo: GLUT1, LDHA y PDHK1.
3. Estudiar, mediante citometría de flujo, la incorporación de glucosa.
4. Comparar los niveles de expresión de GLUT1, LDHA y PDHK1 y de incorporación de glucosa entre
  - 4.1 Células con SIRT6 silenciada y sus respectivos controles portadores del plásmido vacío.
  - 4.2 Células 786-O y Caki-1 WT y células control de riñón humano no tumoral (HEK293).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **ESTUDIO DE BIOMARCADORES DIAGNÓSTICOS Y PRONÓSTICOS EN PACIENTES CON CARCINOMA RENAL CCRcc**

Se realizaron dos tipos de estudios en muestras de pacientes con Carcinoma Celular Renal de células claras (CCRcc): uno retrospectivo sobre tejido tumoral y uno prospectivo utilizando muestras de suero.

#### **1- PACIENTES INCLUIDOS EN LOS ESTUDIOS**

##### **1A- Criterios de inclusión y exclusión de los pacientes**

**Criterios de inclusión:** El paciente debió ser mayor de 18 años; diagnosticado y tratado en el Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo” (IOAHR) o el Hospital Italiano de Buenos Aires (HIBA).

En el caso del estudio de biomarcadores tisulares los pacientes debían tener diagnóstico de CCRcc por histología utilizando la clasificación de WHO (2004); tejidos fijados en formol y embebidos en parafina guardados en la institución participante y que hayan recibido cirugía como tratamiento primario.

Para los estudios en suero los pacientes debían tener confirmación histológica de su patología, previo a la inclusión en el estudio. Además, todos pacientes debían dar su autorización para participar del estudio mediante la firma del Consentimiento Informado correspondiente.

**Criterios de Exclusión:** Un paciente no fue elegible para la inclusión en este estudio si cumplió alguno de los siguientes criterios: mujeres embarazadas o lactantes; pacientes con historia previa o concurrente de otro tumor maligno, a excepción de carcinoma basocelular; pacientes con tratamiento sistémico previo a la extracción de suero o a la cirugía para la extirpación del tumor.

##### **1B- Datos clínico-patológicos**

La información clínica de los pacientes se obtuvo por revisión de las Historias Clínicas. Para esto se confeccionaron fichas (CRF, “*Case Report Form*”) en las cuales se registró toda la información personal y la información relacionada con el diagnóstico y evolución de la enfermedad (como se detalla en el punto siguiente) en forma codificada. Luego, los datos de las CRF se volcaron a bases digitales para facilitar su administración y análisis. Las Historias Clínicas fueron revisadas cada 3 a 6 meses con el fin de actualizar las evoluciones.

En estos tres puntos trabajé activamente y en forma casi exclusiva durante el primer año de mi tesis y en forma simultánea, a mi trabajo de investigación, durante el tiempo restante.



## **1C- Información clínica analizada en pacientes**

### **1C1- Pacientes con CCRcc**

- **Características del paciente:** edad y sexo.

- **Factores de riesgo:** Se registró si el paciente tenía alguno de los factores de riesgo descritos para CCRcc: hipertensión arterial (HTA), tabaquismo u obesidad.

- **Performance Status (Score de WHO, ECOG o Zubrod) (PS):** Escala que se utiliza en pacientes con cáncer y que permite cuantificar el estado general del paciente en su actividad diaria. Se divide en 5 categorías con los siguientes criterios:

**PS0-** Asintomático. Activo 100% y capaz de realizar todas las actividades que realizaba previo a la enfermedad y sin restricción.

**PS1-** Sintomático pero completamente ambulatorio.

**PS2-** Sintomático pero pasando menos del 50% del día en cama. Es capaz de hacerse cargo del cuidado personal pero incapaz de trabajar. En pie cerca del 50% del tiempo en que está despierto.

**PS3-** Sintomático pero pasando más del 50% del día en cama, no postrado. Capaz de un cuidado personal limitado. Confinado a una cama o silla cerca del 50% de tiempo en que está despierto.

**PS4-** Postrado. Sin capacidad de realizar actividades de cuidado personal. Totalmente confinado a una cama o silla.

**PS5-** Muerto

- **Grado nuclear o de Fuhrman (G):** Escala descriptiva de la morfología nuclear de las células tumorales. La descripción la hace el patólogo, observando cortes tumorales, teñidos con hematoxilina eosina, al microscopio óptico. Se diferencian 4 grados descriptos de la siguiente manera (201).

**Grado 1-** Núcleos redondos, uniformes (aproximadamente 10 micras); nucléolos no visibles a 400x.

**Grado 2-** Núcleos más grandes (aproximadamente 15 micras) con contornos irregulares; se ven pequeños nucléolos a 400X.

**Grado 3-** Núcleos más grandes (aproximadamente 20 micras) con contornos más irregulares; nucléolos prominentes visibles a 100X.

**Grado 4-** Características del grado 3 más núcleos pleomórficos o multilobulados, con o sin células fusiformes (sarcomatoides).

- **Tamaño tumoral (T):** Medida macroscópica del tamaño del tumor extirpado. Se mide por el diámetro mayor y se expresa en cm. Se clasifica en las siguientes categorías (Figura 11).

**Tx-** No se puede valorar el tumor primario.

**T0-** Tumor primario no evidente.

**T1-** Tumor  $\leq 7$  cm limitado al riñón.

**T1a-** Tumor  $\leq 4$  cm.

**T1b-** Tumor  $> 4$  pero  $\leq 7$  cm.

**T2-** Tumor  $> 7$  cm limitado al riñón.

**T2a-** Tumor  $> 7$  cm pero  $\leq 10$  cm.

**T2b-** Tumor  $> 10$  cm.

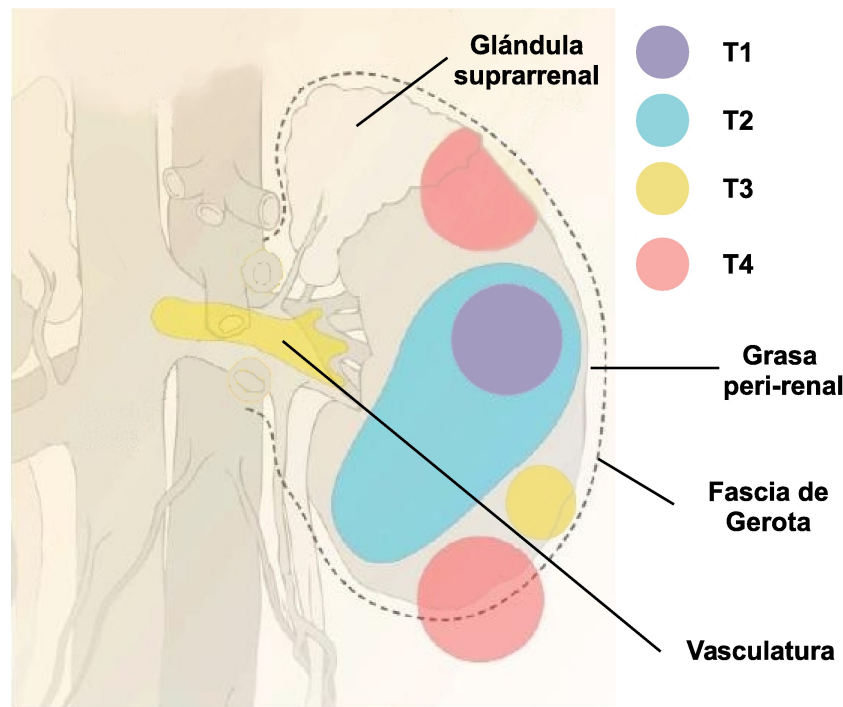
**T3-** Extensión a venas renales mayores o grasa perirrenal sin pasar fascia de Gerota.

**T3a:** Invasión directa de la vena renal o de la grasa perirrenal, sin traspasar la fascia de Gerota.

**T3b:** Extensión macroscópica a la vena cava por debajo del diafragma.

**T3c:** Extensión macro a la vena cava por encima del diafragma.

**T4-** Invasión más allá de la fascia de Gerota o de la glándula suprarrenal ipsilateral.



**Figura 11: Clasificación de los CCR según el tamaño tumoral<sup>3</sup>.**

3 Adaptado de Cohen *et al.* 2005

**-Presencia de Metástasis a distancia (M):**

**Mx-** No se puede valorar presencia de metástasis.

**M0-** No hay metástasis.

**M1-** Hay metástasis.

**- Estadío (E):** Se determina teniendo en cuenta el TNM. N es otro parámetro que no fue tenido en cuenta en los análisis estadísticos, pero si para la determinación del estadio tumoral, y que implica la evaluación de los nodos linfáticos, N según si fueron invadidos (N1) o no (N0) por el tumor.

**EI-** T1N0M0.

**EII-** T2N0M0.

**EIII-** T1N1M0, T2N1M0, T3N0M0 o T3N1M0.

**EIV-** T4N0M0, T4N1M0, cualquier T + cualquier N +M1.

**- Datos de supervivencia:** se calculó el tiempo transcurrido, en meses, tomando como inicio la fecha de cirugía.

**Supervivencia Global (SVG)-** Hasta la fecha de muerte o de la última consulta. En el caso que un paciente fallezca por otra causa no asociada a su enfermedad se lo consideró como vivo con fecha del día previo al de su muerte.

**Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE)-** Hasta la fecha de recurrencia, en caso de haberse producido.

**1C2- Pacientes con cáncer de mama**

**-Edad.**

**-Grado nuclear:**

**X-** Grado nuclear indeterminado

**1-** Núcleos pequeños y uniformes (similares a los del tejido vecino). No se observan nucléolos prominentes.

**2-** Núcleos medianos a grandes. Exhiben moderada variabilidad de tamaño forma e intensidad y patrón de tinción. Presentan nucléolos prominentes.

**3-** Núcleos grandes y vesiculados. Presentan agrupamientos de cromatina. Marcado incremento en tamaño y marcada irregularidad. Nucléolos grandes, muchas veces múltiples.

**-Grado histológico:**

**GX-** Grado de diferenciación indeterminado.

**G1-** Bien diferenciado.

**G2-** Moderadamente diferenciado.

**G3-** Indiferenciado.

**-Tamaño tumoral (T):** Medida macroscópica del tamaño del tumor extirpado. Se mide por el diámetro mayor y se expresa en cm. A grandes rasgos se clasifica en las siguientes categorías.

**T0-** Tumor primario no evidente.

**T1-** Tumor  $\leq 2$  cm.

**T2-** Tumor  $> 2$  cm pero  $\leq 5$  cm.

**T3-** Tumor  $> 5$  cm.

**T4-** Tumor de cualquier tamaño en su diámetro mayor pero extendido a la pared torácica o piel.

**-Estadio (E):** Se determina teniendo en cuenta el TNM. La clasificación del T en cáncer de mama es muy compleja y excede al objetivo de este segmento. Las categorías analizadas en este estudio fueron EI, EII, EIII y EIV (que implica, siempre, presencia de metástasis a distancia) (12).

**-Tipo histológico:**

En este estudio se incluyeron pacientes con histología invasora: a) Carcinoma ductal invasor: Es el tipo más común y representa el 52% de los carcinomas mamarios. Suele presentarse como un nódulo retráctil e histológicamente está formado por conductos atípicos, cordones o nidos celulares, b) Carcinoma lobular invasor: Constituye del 5 al 10% de los carcinomas de mama y se caracteriza por ser bilateral y multicéntrico. Son tumores pobremente circunscriptos. El patrón infiltrante típico consiste en hileras de una célula o “fila india”.

**-Expresión del receptor de estrógenos (RE), receptor de progesterona (RP) y receptor HER2:**

Estos datos fueron recopilados de las historias clínicas, de acuerdo a los estándares internacionales para la definición de positividad para cada marcador. También se consignó aquellos tumores que fueron triple negativo por criterios histológicos (RE-PR-HER2-).

**- Datos de supervivencia:** Ídem para CCRcc.

## **1D- Aspectos éticos**

El estudio prospectivo, en el que se analizaron muestras de suero de pacientes, fue aprobado por los comités de ética y docencia de ambas instituciones, el CEI (Comité de Ética en investigación) del IOAHR y el CEPI (Comité de Ética de protocolos de investigación) del HIBA (ANEXO). Los donantes, además, firmaron los Consentimientos Informados (CI) correspondientes administrados por el Biobanco Público de Muestras Séricas Oncológicas (BPMSO) del IOAHR. El BPMSO tiene un “CI general” para ser donante del BPMSO y, en este estudio en particular, un segundo “CI específico” para participar en el protocolo de búsqueda de biomarcadores circulantes. Se cumplieron las normas éticas de manejo y administración de muestras e información clínica, establecidas por el biobanco

El estudio retrospectivo, en el que se estudiaron muestras de tejido tumoral de pacientes del IOAHR, también fueron aprobadas por el comité de ética y docencia de las instituciones involucradas.

En todos los casos se siguieron minuciosamente las recomendaciones de la Declaración de Helsinki.

## 2- ESTUDIO DE MARCADORES TISULARES (CAIX y GLUT1) EN TUMORES CCRcc

### 2A- Población

La Tabla III muestra la distribución en género, edad y estadios de las poblaciones de pacientes con CCRcc incluidas en el estudio retrospectivo.

	GLUT1	CAIX
<b>Total (n)</b>	<b>58</b>	<b>69</b>
<b>Masculino, n [edad (rango)]</b>	<b>32 [54 (46-72)]</b>	<b>40 [57 (44-78)]</b>
<b>Femenino, n [edad (rango)]</b>	<b>26 [62,5 (44-86)]</b>	<b>29 [61 (44-82)]</b>
<b>Estadio</b>		
<b>EI</b>	<b>8</b>	<b>10</b>
<b>EII</b>	<b>18</b>	<b>21</b>
<b>EII</b>	<b>11</b>	<b>13</b>
<b>EIV</b>	<b>20</b>	<b>24</b>
<b>N.D.</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

Tabla III: Distribución de los pacientes CCRcc según género, edad y estadio de las poblaciones incluidas en el estudio retrospectivo. N.D.: estadio no determinado.

### 2B- Técnica de Inmunohistoquímica (IHQ)

Se emplearon cortes histológicos de 4 µm de espesor montados sobre portaobjetos cargados positivamente, de tumores fijados con formaldehído neutro al 10% y embebidos en parafina. Los cortes se desparafinaron con xilol, se hidrataron con alcoholes de graduación decreciente y, finalmente, con agua destilada.

La recuperación antigénica se indujo con buffer de citrato (10 mM de ácido cítrico en agua destilada, pH 6) y en ebullición durante 2 min. en horno de microondas. Para bloquear la actividad de las peroxidasas endógenas se utilizó peróxido de hidrógeno 3% en agua destilada durante 30 min. Para bloquear las uniones inespecíficas se utilizó un reactivo bloqueante universal (*Power Block*, Biogenex) durante 8 min.

Los cortes fueron incubados en cámara húmeda, a 4° C durante 12 hrs. con el anticuerpo primario para CAIX [Abcam (ab107257), dil 1/600] o para GLUT1 [(SPM498), dil 1/350] diluido en PBS. Finalmente, los cortes fueron tratados con Vectastain ABC Kit Universal (Vector Laboratories, USA, Número de Catálogo: PK-6200) y revelados con el cromógeno 3,3' Diaminobencidina (Liquid DAB + Substrate Chromogen System, Dako; Número de Catálogo: K3467). El tejido fue contra-teñido con hematoxilina de Mayer por 4 min, se lavaron en agua corriente durante 5 min., se deshidrataron con alcoholes de graduación creciente, se aclararon con xilol y montaron con bálsamo de Canadá sintético. Se incluyó un corte adicional no expuesto al primer anticuerpo como control negativo para discriminar la tinción de fondo.

## **2C: Evaluación de la expresión antigénica**

La expresión de los marcadores moleculares fue analizada por dos observadores independientes, uno de los cuales es patólogo, que desconocían los datos clínicos y de evolución de los pacientes. Se evaluó la marcación tanto a nivel de membrana como de citoplasma. En algunos casos se consignó la marcación nuclear. En caso de discrepancia en los resultados, los dos observadores reevaluaron los preparados en conjunto hasta llegar a un consenso en la evaluación histoquímica.

Se consignó el porcentaje de células tumorales positivas sobre el total de células. En tumores con marcada heterogeneidad se evaluó la tinción en el área con histología más agresiva. La intensidad de la tinción no fue consignada.

En un segundo paso y mediante métodos estadísticos que se indican en el ítem correspondiente, la expresión antigénica se dicotomizó en tumores que expresan "valores altos" del biomarcador y aquellos que expresan "valores bajos".

## **3- ESTUDIO DE BIOMARCADORES EN SUERO DE PACIENTES CCRcc**

Este proyecto, en el que se analizó el suero de pacientes portadores de CCRcc y de donantes sanos, está asociado al Biobanco Público de Muestras Séricas Oncológicas (BPMSO) del Instituto de Oncología Ángel H. Roffo (IOAHR) y se realizó en forma conjunta con el Hospital Italiano de Buenos Aires (HIBA).

### **3A- Muestras de suero**

Las muestras de suero del "Biobanco Público de Muestras Séricas Oncológicas" del IOAHR (BPMSO) son obtenidas de acuerdo a procedimientos consignados en las POES del Biobanco. Entre los puntos a destacar es su procesamiento inmediato luego de la extracción de sangre y su

almacenamiento a -80°C hasta su utilización. Todas las muestras están libres de Chagas, Brucelosis, HTLV, HIV y Hepatitis B y C.

Además de las muestras de pacientes se analizaron sueros de controles sanos (CS). Los donantes cumplieron con los siguientes criterios de inclusión: individuos con 18 años o más sin enfermedad oncológica previa o concurrente y que hayan aceptado a firmar el correspondiente Consentimiento Informado.

Para estos estudios se añadió además de la Población de pacientes con CCRcc, pacientes con otra patología renal y pacientes con otro tipo de cáncer (cáncer de mama) cuyos criterios de inclusión/exclusión fueron los mismos indicados en el punto general para los pacientes CCRcc. Estas muestras de suero también fueron obtenidas del BPMSO.

Para todas las técnicas, las muestras de suero fueron descongeladas a 0°C al momento de uso. Solo se descongelaron una vez.

### 3B- Análisis de la expresión de CAIX, FGF21 y Leptina mediante Test ELISA

#### 3B1- Población

La Tabla IV muestra la distribución en género, edad y estadios de las poblaciones de pacientes con CCRcc incluidas en el estudio prospectivo.

	CAIXs	FGF21s	Leptina sérica
<b>CONTROLES SANOS</b>			
<b>n</b>	<b>45</b>	<b>51</b>	<b>50</b>
<b>Masculino, n [edad (rango)]</b>	<b>30 [43 (23-64)]</b>	<b>25 [42 (23-63)]</b>	<b>25 [42 (23-63)]</b>
<b>Femenino, n [edad (rango)]</b>	<b>15 [42 (26-64)]</b>	<b>26 [44,5 (20-63)]</b>	<b>25 [45 (20-63)]</b>
<b>PACIENTES CCRcc</b>			
<b>n</b>	<b>91</b>	<b>98</b>	<b>25</b>
<b>Masculino, n [edad (rango)]</b>	<b>64 [60,5 (42-84)]</b>	<b>69 [61 (42-85)]</b>	<b>20 [61,5 (43-85)]</b>
<b>Femenino, n [edad (rango)]</b>	<b>27 [58 (43-75)]</b>	<b>29 [57 (43-75)]</b>	<b>5 [53 (51-66)]</b>
<b>Estadio</b>			
<b>EI</b>	<b>29</b>	<b>37</b>	<b>7</b>
<b>EII</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>4</b>
<b>EIII</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>6</b>
<b>EIV</b>	<b>29</b>	<b>27</b>	<b>8</b>
<b>Total M1 y M2</b>	<b>57</b>	<b>30</b>	<b>-</b>
<b>PACIENTES CCRcrb</b>			
<b>n</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>-</b>
<b>Masculino, n [edad (rango)]</b>	<b>8 [55 (23-71)]</b>	<b>8 [55 (23-71)]</b>	<b>-</b>
<b>Femenino, n [edad (rango)]</b>	<b>6 [57,5 (31-75)]</b>	<b>6 [57,5 (31-75)]</b>	<b>-</b>
<b>PACIENTES CÁNCER DE MAMA</b>			
<b>n</b>	<b>20</b>	<b>45</b>	<b>43</b>
<b>Edad: Md (Rango)</b>	<b>[57,5 (32-83)]</b>	<b>[59 (32-88)]</b>	<b>[58 (32-88)]</b>

Tabla IV: Distribución según género, edad y estadio de las poblaciones incluidas en el estudio prospectivo.



### 3B2- Técnica ELISA

Para estudiar la expresión de las moléculas séricas CAIX, FGF21 y Leptina se utilizaron kits de ELISA comerciales de R&D Systems ® y se siguieron las instrucciones del proveedor.

Brevemente, la técnica de los tests ELISA “sandwich” con detección colorimétrica (Figura 12), consiste en determinar la concentración de una molécula en una muestra, en este caso de suero, mediante la utilización de una curva de calibración. El kit provee de todos los elementos necesarios para la realización del dosaje. El anticuerpo específico está fijado a una placa con múltiples pocillos. Salvo para el ELISA para detectar Leptina sérica, en el que la muestra se diluye 1/100, las muestras se usaron con la concentración original. La muestra se incubó por 2 hs. a temperatura ambiente, se realizaron varios lavados con un buffer de lavado. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario, también por 2hs a temperatura ambiente, luego de lo cual se realizan varios lavados. Este anticuerpo secundario está conjugado con una enzima que, al agregarle el sustrato específico, desarrolla una reacción química que produce un color cuya intensidad depende de la cantidad de proteína presente en la muestra. Esta intensidad puede ser medida con un espectrofotómetro aplicando los filtros correspondientes.

Para la cuantificación de estas moléculas, se siguieron las recomendaciones del manual del producto. Brevemente, realizando diluciones seriadas de una muestra de concentración conocida de la proteína específica brindada por el kit se confeccionó una curva de calibración utilizando el valor de concentración y la absorbancia medida por el espectrofotómetro. Con estos valores se generó una ecuación que permite conocer la concentración de la proteína específica presente en la muestra a partir de la absorbancia medida.

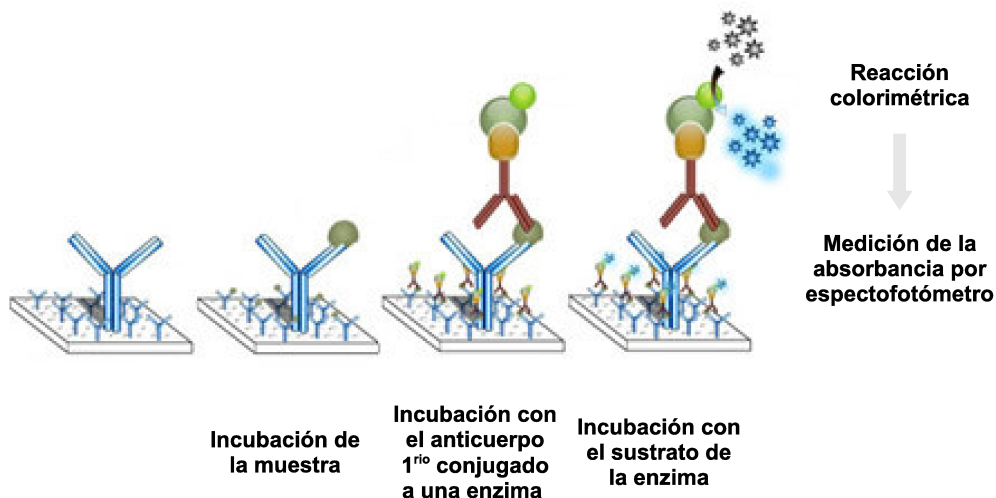


Figura 12: Representación esquemática del procedimiento para el desarrollo de la técnica de ELISA “sandwich”.

**FGF21 sérica (FGF21s):** Se empleó el test “*Human FGF-21 Quantikine ELISA Kit*”, de R&D Systems, N° de Catálogo: DF2100. El mismo posee especificidad para FGF21 humana y no tiene reacción cruzada con FGF19 y FGF23 humanas. De acuerdo a la información del catálogo, la mediana y el rango de la Mínima Dosis Detectable (MDD) es de 4,67 pg/ml (1,61-8,69). El error intraensayo, evaluado por nosotros, por duplicación de algunas muestras al azar, en la misma placa, fue del 13%. El error interensayo, medido por repetición de la medición de algunas muestras elegidas al azar, en diferentes placas, fue del 10%.

**CAIX sérica (CAIXs):** Se empleó el test “*Human Carbonic Anhydrase IX Quantikine ELISA Kit*” (R&D Systems, N° de Catálogo: DCA900). El kit posee especificidad para CAIX humana y no tiene reacción cruzada con otras anhidrasas carbónicas humanas (evaluado para las CA1-8 y 10-14). La mediana y el rango de la MDD es de 2,28 pg/ml (0,665-4,39). El error intraensayo es del 12% y el interensayo de un 15%.

**Leptina sérica:** Se empleó el test “*Human Leptin Quantikine ELISA Kit*”, R&D Systems, N° de Catálogo: DLP00. El test posee especificidad para Leptina humana. Se evaluó su reactividad con múltiples moléculas circulantes humanas para las que no hubo detección inespecífica. La MDD es menor al 7,8 pg/ml. El error intraensayo fue del 3% y el interensayo del 8%.

### **3B3-Cuantificación de otros parámetros séricos**

Para el estudio de medición de FGF21s se analizaron, además, componentes del perfil lipídico (colesterol, triglicéridos, LDL, HDL), la glucemia y el “*clearance* de creatinina”. Este último fue calculado a partir del valor de creatininemia obtenida de la historia clínica de los pacientes y utilizando la fórmula de Cockcroft-Gault. El valor de colesterol, triglicéridos, HDL, LDL y glucemia fue medido en el suero de 51 CS, 30 pacientes con CCRcc y 45 pacientes con cáncer de mama, en el laboratorio central del IOAHR utilizando un equipo Cobas C311 (Roche ®).

### **3C- Análisis de la expresión de 43 moléculas angiogénicas mediante el uso de la técnica de microarray de proteínas (Antibody Array)**

#### **3C1- Población**

Se incluyeron 14 CS, de los cuales 7 eran hombres [Edad; Md (rango): 37 (27-52)] y 7 mujeres [35 (26-49)] y 26 pacientes con CCRcc, 17 hombres [65 (42-85)] y 9 mujeres [53 (48-68)]. En función del estadio se incluyeron 13 EI y 13 EIV.

### 3C2- Técnica de Antibody Array

Para el análisis de moléculas relacionadas con el proceso angiogénico, se utilizaron *kits* de microarray de proteínas “RayBio® *Human Angiogenesis Antibody Array C Series 1000*” (N° de Catálogo: AAH-ANG-1000) y se siguieron las instrucciones del proveedor. Esta técnica permite el estudio simultáneo de la expresión de múltiples proteínas y no requiere ninguna tecnología compleja para la lectura de los resultados.

Esta técnica consta de *spots* que contienen anticuerpos contra determinadas proteínas conocidas (en este caso relacionadas con el proceso angiogénico), los cuales se encuentran adsorbidos sobre soportes tipo celuloide. Cada muestra de suero se incubó con dos membranas provistas por el *kit*, que permite detectar 43 moléculas diferentes al mismo tiempo (Tablas V).

POS	POS	NEG	NEG	Angiogenina	EGF	ENA-78	b FGF
POS	POS	NEG	NEG	Angiogenina	EGF	ENA-78	b FGF
GRO	IFN- $\gamma$	IGF-I	IL-6	IL-8	Leptina	MCP-1	PDGF-BB
GRO	IFN- $\gamma$	IGF-I	IL-6	IL-8	Leptina	MCP-1	PDGF-BB
PIGF	RANTES	TGF- $\beta$ 1	TIMP-1	TIMP-2	Trombopoietina	VEGF	VEGF-D
PIGF	RANTES	TGF- $\beta$ 1	TIMP-1	TIMP-2	Trombopoietina	VEGF	VEGF-D
BLCO	BLCO	BLCO	BLCO	BLCO	BLCO	NEG	POS
BLCO	BLCO	BLCO	BLCO	BLCO	BLCO	NEG	POS

POS	POS	NEG	NEG	Angiopietina-1	Angiopietina-2	Angiostatina	Endostatina
POS	POS	NEG	NEG	Angiopietina-1	Angiopietina-2	Angiostatina	Endostatina
G-CSF	GM-CSF	I-309	IL-10	IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-2	IL-4
G-CSF	GM-CSF	I-309	IL-10	IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-2	IL-4
I-TAC	MCP-3	MCP-4	MMP-1	MMP-9	PECAM-1	Tie-1	TNF- $\alpha$
I-TAC	MCP-3	MCP-4	MMP-1	MMP-9	PECAM-1	Tie-1	TNF- $\alpha$
u PAR	VEGF R2	VEGF R3	BLCO	BLCO	BLCO	BLCO	POS
u PAR	VEGF R2	VEFG R3	BLCO	BLCO	BLCO	BLCO	POS

**Tabla V: Representación gráfica de la ubicación de las moléculas en la membrana 1(arriba) y membrana 2 (abajo) del microarray de preoteínas.**

El *kit* provee todos los elementos necesarios para la cuantificación de las proteínas. Brevemente, primero se bloquearon las membranas durante 30 min. con buffer de bloqueo. La muestra de suero, diluida al medio con buffer de bloqueo, se colocó sobre las membranas y se

incubó 2 hs. a temperatura ambiente. Se hicieron lavados exhaustivos a fin de sacar el material libre, se incubó con un *pool* de anticuerpos secundarios biotinilados durante 2 hs. a temperatura ambiente, se lavó nuevamente y se incubó con estravidina conjugada con HRP durante 2 hs. a temperatura ambiente. Por último, las membranas se incubaron con buffer ECL que provee el sustrato para que la enzima HRP produzca luz, la cual es captada por placas radiográficas de alta sensibilidad que posteriormente son reveladas con los reactivos correspondientes. Las placas radiográficas fueron escaneadas. La señal se cuantificó mediante densitometría utilizando el programa ImageJ. Los valores de cada molécula se relativizaron a los *spots* que contenían los controles positivos y que eran parte del diseño del kit. Así se obtuvo un valor de proteína relativo expresado en unidades arbitrarias (UA).

Según el catálogo, el error interensayo del kit es del 10%.

### **3D- Estudio metabolómico preliminar por Cromatografía Líquida de Ultra Performance acoplada a Espectrometría de Masas de alta resolución (UPLC-QTOF-MS)**

#### **3D1- Población**

En un estudio preliminar se analizaron sueros de 5 CS [Edad: Mediana; (Rango): 58, (40-54)] y 5 EIV [65 (56-72)].

#### **3D2- Preparación de las muestras**

Se agregó isopropanol a 100 µL de suero en una relación 3:1. Se mezcló con vortex durante 10 s y se centrifugó a 13.000 rpm por 7 min. a 4 °C. Se extrajo el sobrenadante y se congeló la mezcla a -80 °C, la cual fue posteriormente liofilizada durante 48 hs hasta alcanzar una presión de 0,06 mbar, utilizando un liofilizador LyoQuest -85 Plus ECO de (Telstar). Las muestras liofilizadas se almacenaron a -80 °C hasta su análisis por UPLC-QTOF-MS. Los residuos sólidos se reconstituyeron con 100 µL de una mezcla de acetonitrilo:agua (10:90). De esta manera, la concentración de los metabolitos no cambia respecto de la muestra de partida. Todos los solventes utilizados, tanto para la preparación de las muestras como para el análisis por UPLC-QTOF-MS fueron de calidad HPLC-MS. El agua ultrapura (resistividad 18 MΩ.cm) fue obtenida de un sistema de purificación de agua Micropure de Barnstead (Thermo Scientific) acoplado a un sistema de ósmosis inversa (Gota a Gota S.R.L.). Las muestras fueron analizadas en orden aleatorio por duplicado junto a blancos de solvente y blancos del protocolo de preparación de las muestras y a controles de calidad (QC) que se intercalan en el análisis para verificar que la forma e intensidad de sus señales sea estable a lo largo del análisis. Como QC se utilizó una mezcla de compuestos

comerciales de concentración conocida. Los blancos de preparación de las muestras se obtuvieron al efectuar el mismo tratamiento de los sueros, a 100  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura.

### 3D3- Análisis por Cromatografía Líquida acoplado a Espectrometría de Masas (UPLC-QTOF-MS)

Se utilizó un cromatógrafo líquido de ultra performance (ACQUITY UPLC I Class de Waters Corp.) acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución (Xevo G2S Q-TOF de Waters Corp.) con un poder de resolución de 32.000  $M/\Delta m$  (FWHM).

Las muestras se analizaron por cromatografía en fase reversa mediante el empleo de una columna C18 de UPLC (ACQUITY BEH C18 2,1 mm x 100 mm x 1,7  $\mu\text{m}$  de diámetro de partícula, Waters Corp.). El análisis cromatográfico fue realizado a una temperatura de 55  $^{\circ}\text{C}$ , con un caudal de 0,4  $\text{mL min}^{-1}$ , inyectando 2  $\mu\text{L}$  de muestra. Las muestras se conservaron a 5  $^{\circ}\text{C}$  durante el análisis. Para la separación cromatográfica se utilizaron las siguientes mezclas de solventes: fase móvil A = acetonitrilo/solución acuosa de ácido acético 0,1% y acetato de amonio 10 mM, (60:40 v/v) y fase móvil B = isopropanol/solución de ácido acético 0,1% y acetato de amonio 10 mM en acetonitrilo (90:10 v/v). El gradiente de solventes utilizado en el método cromatográfico se detalla en la tabla VI. Una vez analizada la muestra, el sistema se estabiliza en las condiciones iniciales del gradiente de solventes en un tiempo de 11 min.

Tiempo (min)	%A	%B
Inicial	60	40
2	57	43
2,1	50	50
12	46	54
12,1	30	70
18	1	99

**Tabla VI: Gradiente de solventes utilizado en la separación cromatográfica.**

El espectrómetro de masas fue operado en modo de ionización por electrospray positivo ( $\text{ESI}^+$ ) y negativo ( $\text{ESI}^-$ ). Para ello, se utilizaron las siguientes condiciones: voltaje en el capilar: 2,3 kV ( $\text{ESI}^-$ ) y 2,5 kV ( $\text{ESI}^+$ ); voltaje del cono: 30 V; voltaje offset: 80 V; temperatura de la fuente: 120  $^{\circ}\text{C}$ ; temperatura de desolvatación: 350  $^{\circ}\text{C}$ ; caudal de desolvatación: 600  $\text{L h}^{-1}$ ; caudal en el cono: 10  $\text{L h}^{-1}$ . El espectrómetro de masas fue calibrado diariamente, antes del análisis del *batch* de muestras, en el intervalo de  $m/z$  50–1200 utilizando una solución de formiato de sodio 0,5 mM preparada

en isopropanol/agua (90:10 v/v). Los datos se corrigieron durante la adquisición utilizando una solución de leucina encefalina ( $1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ) como compuesto de referencia (LockSpray), que fue inyectado a  $2 \mu\text{L min}^{-1}$ . El procesamiento de los datos se efectuó utilizando el software MassLynx v4.1 (Waters Corp.).

#### **4- ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se realizaron los tests de Kolmogorov Smirnov y Shapiro Wilk para testear la normalidad de los datos. El test de Spearman se utilizó para el análisis de correlación de variables continuas. La asociación entre la expresión de los diferentes antígenos y factores de pronóstico conocidos para CCRcc se analizó mediante el tests de  $X^2$ . Para estudiar la asociación de variables categóricas se realizaron regresiones logísticas y la prueba de Hosmer y Lemeshow se utilizó para evaluar la bondad del ajuste. El test de Tau de Kendall se utilizó para evaluar la correlación entre variables ordinales y variables continuas.

Es importante aclarar que, si bien la mayoría de los gráficos de dispersión poseen una línea de tendencia ajustada por diferencia de mínimos cuadrados, ésta es sólo de referencia y para colaborar con una mejor visualización de los datos. Salvo aclaración, no se hicieron regresiones lineales.

En algunos gráficos *Boxplot* se disminuyó el valor máximo de la escala de concentración de moléculas para mejorar la visualización de los datos. De esta manera, algunos valores *outliers* quedan fuera del gráfico.

Los métodos de Kruskal Wallis y Mann Whitney se utilizaron para comparar medias de datos no paramétricos.

Los métodos de Kaplan-Meier y Log Rank test se utilizaron para evaluar la supervivencia global (SVG) y la libre de enfermedad (SLE). El análisis multivariado de la supervivencia se realizó mediante el test de COX.

El árbol de clasificación se utilizó para analizar la SLE en los experimentos de FGF21s. Este método consiste en la partición sucesiva del conjunto de datos. Inicialmente todos los objetos son considerados como pertenecientes al mismo grupo. El grupo se separa en dos subgrupos a partir de una de las variables regresoras de manera tal que la heterogeneidad, a nivel de la variable dependiente, sea mínima. Los dos subgrupos (nodos) formados se separan nuevamente si hay suficiente heterogeneidad para producir una partición de observaciones. En cada paso, para realizar la partición, el algoritmo selecciona todas las variables regresoras y selecciona aquella que permite conformar grupos más homogéneos dentro y más heterogéneos entre ellos.

Los resultados obtenidos utilizando la técnica de microarray de proteínas se analizaron por el método multivariado de Análisis por Componentes Principales (PCA), ya que se contaba con los datos de concentración de 43 moléculas, cada una de las cuales se analizó como una variable independiente. PCA es un método de extracción de patrones que busca reducir la dimensionalidad del problema. Éste es un método exploratorio multivariado no supervisado que consiste en proyectar el conjunto de datos originales en una nueva base de igual dimensión  $N$ , la cual está definida por los autovectores de la matriz de covarianza de los datos, dado que en esa base la varianza es máxima. Este método permite visualizar tendencias, patrones y la posible discriminación entre las clases debido a la formación de *clusters*.

Una vez efectuado el análisis de muestras por UPLC-QTOF-MS, se obtuvieron los perfiles metabólicos, que se analizaron y compararon mediante métodos estadísticos de análisis multivariado. Para ello, se obtuvieron los pares de tiempos de retención y valores de  $m/z$  relacionados ( $t_r$ ,  $m/z$ ). Este proceso involucra el alineamiento de los cromatogramas, la identificación e integración de las señales, y su normalización. Para ello se utilizó el software Progenesis Q1 (Waters Corp.) con licencia para el CIBION. Para el análisis estadístico se aplicó, en primer lugar, PCA que permitió visualizar tendencias, e identificar *outliers*. Luego, se utilizó el método supervisado de proyección ortogonal a estructuras latentes con análisis discriminante, del inglés *orthogonal projection to latent structures-discriminant analysis* (oPLS-DA) para clasificar las muestras de acuerdo con su clase y obtener un panel de metabolitos discriminantes. El análisis estadístico también fue efectuado mediante el módulo EZinfo 3.0.3 Umetrics (Suecia) acoplado al software Progenesis Q1 (Waters Corp.). Para la identificación de los metabolitos discriminantes se utilizaron las bases de datos públicas de metabolómica de METLIN (202) y HMDB (46).

Se consideró que una diferencia estadísticamente significativa cuando  $p < 0,05$ .

Para el análisis estadístico y para elaborar los gráficos de las figuras se utilizaron los *softwares* SPSS versión 18 para Windows® e InfoStat versión 2015 con licencias aprobadas para la cátedra de matemática de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. También se utilizó el software libre R por medio de la interfaz gráfica R Studio 0.98.490. ImageJ 1.48K; también libre, se utilizó para determinar la densitometría de las placas radiográficas tanto para el microarray de proteínas, como para los WB.

## **ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO CELULAR EN CÉLULAS DE CARCINOMA RENAL CCRcc**

### **Líneas celulares**

Las células humanas de Carcinoma Celular Renal de células claras 786-O (VHL<sup>-/-</sup>) y Caki-1 (VHL<sup>+/+</sup>) fueron adquiridas de la ATCC (*American Type Culture Collection*), donadas por el Dr. Raúl Mostoslavsky. Las células HEK 293 fueron obtenidas del MHG (*Massachusetts General Hospital*) Cancer Center. Todas las células fueron mantenidas con medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina, 100 U.I./ml de Penicilina y 100 µg/ml de Estreptomicina; en estufa a 37°C con atmósfera húmeda y gaseada con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se repicaron por tripsinización de las monocapas subconfluentes (0,25% tripsina, 0,02% EDTA en PBS).

Se controló periódicamente la ausencia de contaminación con micoplasma. Para esto, se utilizó DAPI, intercalante de bases nitrogenadas, a fin de determinar la presencia de ácido nucleico extranuclear.

### **Silenciamiento de SIRT6: infección con lentivirus**

#### **Plásmidos**

Los plásmidos utilizados para la síntesis de lentivirus se describen a continuación:

**1. pTripZ** (Thermo Scientific® *Open Biosystems Expression Arrest TRIPZ Lentiviral shRNA*mir) clonado con ShARN de SIRT6 (*MGH consortium*). Se trata de un vector inducible con Doxiciplina (derivado de Tetraciclina) que tiene el gen RFP (*Red Fluorescence Protein*) río arriba del sitio de clonado, lo que permite identificar las células inducidas utilizando un microscopio de fluorescencia.

Como agente de selección se empleó Puomicina. Además, el plásmido posee 2 regiones LTR para permitir la inserción del ShARN, del gen de selección y del de RFP, por traslocación, permitiendo un silenciamiento estable. El vector clonado se utilizó para generar las líneas ShSIRT6 (Sh) y el vector vacío para generar las líneas control (V), que expresan SIRT6 WT.

**2. “Helpers de lentivirus”** (*MGH consortium*): Se utilizó un sistema de 4 plásmidos que codifican las proteínas necesarias para la síntesis de los lentiviruses. Los plásmidos **tat** y **rev**, codifican las proteínas, del mismo nombre, propias de lentivirus. El plásmido **VSV-g**, codifica la proteína VSV que conforma la nucleocápside del virus y una proteína glicosilada que forma parte de la envoltura y es necesaria para el reconocimiento de la célula blanco. El plásmido **gag-pol**, codifica la proteína gag, involucrada en la formación de la envoltura y la ARN-polimerasa propia del virus.



## **Síntesis de lentivirus**

Los lentivirus (cedidos por el MGH) fueron empaquetados en células HEK 293T. Se utilizó Trans IT 293 (Mirus®) como agente de transfección.

Brevemente, se sembraron células HEK 293T en una placa de Petri de 15 cm<sup>2</sup>, con medio DMEM suplementado con 10% SFB, 2 mM de L-glutamina, 100 U.I./ml de Penicilina y 100 µg/ml de Streptomycin. A las 24hs., cuando las monocapas alcanzaron el 90% de confluencia, se transfectaron con los plásmidos tat, rev, gag-pol, VSV-g y pTripZ Sh o V. Para esto, se mezclaron los 5 plásmidos (37,5 µg ADN compuestos por 30 µg de plásmido pTRIPZ Sh o V, 1,5 µg de los plásmidos tat, rev, gag-pol y 3 µg del plásmido VSV-g) con 3 µl de Trans IT 293 en 2 ml de medio MEM por placa de 15 cm<sup>2</sup> y junto con 13 ml de medio DMEM completo se incubó en estufa gaseada a 37 °C. A las 48 hs. de incubación se colectó la primera cosecha (sobrenadante) y a las 12 hs. la segunda. Las cosechas fueron concentradas por ultracentrifugación durante 1,5 hs. a 150.000 xg, se descartó el sobrenadante y el *pellet* de virus se resuspendió en el sobrenadante restante, se alicuotó y guardó a -80 °C.

## **Infección de células con lentivirus**

Las células 786-O y Caki-1 fueron infectadas con 1 µl de la alícuota de lentivirus (lo que equivale, aproximadamente, a una MOI de alrededor de 0,3 unidades transformantes por célula, garantizando que sólo un 4% de las células tendrá más de un inserto) utilizando Polibrene 1 µg/ml (EMD Millipore®) para aumentar la eficiencia de infección. Para esto se sembraron 100.000 células 786-O o Caki-1 por pocillo en una placa *multiwell* de 6 pocillos. Al día siguiente, cuando la monocapa alcanzó el 60% de confluencia, un pocillo por línea celular se infectó con el virus portador del vector V y otro con el virus portador del vector Sh. Las células se incubaron durante 48 hs. a 37 °C antes de comenzar la selección.

## **Selección de las células infectadas**

Para seleccionar sólo aquellas células que incorporaron el inserto las monocapas se incubaron por un período de 5 a 7 días con Puromicina (Thermo Fisher Scientific®) 2 µg/ml (concentración necesaria para matar el 100% de las células no infectadas en ese período). Esa misma concentración se utilizó para el mantenimiento de las líneas.

## **Inducción del silenciamiento de SIRT6**

Como se mencionó anteriormente la expresión del ShARN de SIRT6 con el vector utilizado, se realizó por inducción con Doxíciclina. Para esto, las células se incubaron durante una semana

(período necesario para la máxima inducción del sistema) con 1 ug/ml de Doxyciclina (Sigma Aldrich®). La misma concentración del antibiótico se usó para el mantenimiento de las líneas lo que garantiza el silenciamiento de SIRT6 durante la realización de los experimentos.

### Lisados de líneas celulares

Para el análisis de la expresión de SIRT6 o de enzimas relacionadas con la glucólisis, las células se sembraron para tener una confluencia de, aproximadamente, el 70%. El medio se cambió 2 hs. antes de la lisis por medio fresco completo. La lisis se realizó con buffer de lisis [Tritón-X 100 1%, glicerol 10%, HEPES 50 mM, Na Cl 150 mM, inhibidores de proteasas: 1 tableta (Roche ®) por cada 10 ml de buffer e inhibidores de fosfatasas: 50 mM NaF/ 0,2 mM sodio ortovanadato], sonicación a 4 °C durante 10 min. y posterior centrifugación a 17.000 xg a 4 °C durante 10 min. La cantidad de proteína se cuantificó por el método de Bradford.

### Western blots

Para realizar SDS-PAGE se utilizaron geles de distintos porcentajes de poliacrilamida según correspondiera. A los lisados celulares se les agregó buffer de siembra con 10% de  $\beta$ -mercaptoetanol y se calentaron durante 5 min. a 95 °C para la mayoría de las proteínas o durante 2 min. a 37 °C para GLUT1. Se sembraron 25  $\mu$ g de proteína por calle. La corrida se llevó a cabo con buffer Tris-Glicina. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF. El WB se realizó utilizando los anticuerpos primarios detallados en la Tabla VII. La detección se realizó por reacción lumínica utilizando anticuerpos secundarios conjugados a HRP, buffer ECL con los sustratos de la enzima y placas radiográficas de alta sensibilidad.

Antígeno	Especie	Dilución	Solución	Marca
SIRT6	Conejo	1/1000	BSA 3%	abcam: ab62739
LDHA	Conejo	1/1000	BSA 3%	Cell Signal #2012
PDHK1	Conejo	1/2000	BSA 3%	Cell Signal # 3820
GLUT1	Ratón	1/1000	BSA 3%	abcam: ab 40084
$\beta$ -actina (C4)	Ratón	1/5000	Leche 5%	Santa Cruz: sc-47778
H3	Conejo	1/4000	BSA 5%	abcam: ab1791
CAIX	Ratón	1/250	BSA 3%	abcam: ab107257

Tabla VII: Listado de anticuerpos primarios utilizados para realizar los *western blots*.

La cuantificación de la expresión de las diferentes proteínas se realizó mediante el programa Image J que densitometra las bandas obtenidas.

### **Ensayo de incorporación de glucosa por citometría de flujo**

El ensayo de incorporación de glucosa se realizó utilizando glucosa marcada, 2-NBDG (Invitrogen®). Las células se sembraron en condiciones normales, en placas *multiwell* de 6 pocillos el día anterior, de manera tal de obtener una confluencia de alrededor del 70%. Se preparó medio fresco con 2-NBDG a una concentración de 100 mM. Las células se incubaron durante 2 hs. a 37°C. Al menos un pocillo por tipo celular se incubó sin 2-NBDG para usar como blanco. Las células levantaron por tripsinización y se lavaron con PBS y centrifugación a 300 xg por 5 min. Por último, se resuspendieron en 1 ml de PBS 1% BSA y se transfirieron a tubos de citometría. La fluorescencia se midió mediante la utilización del citómetro FACSCalibur Analyzer (BD®).

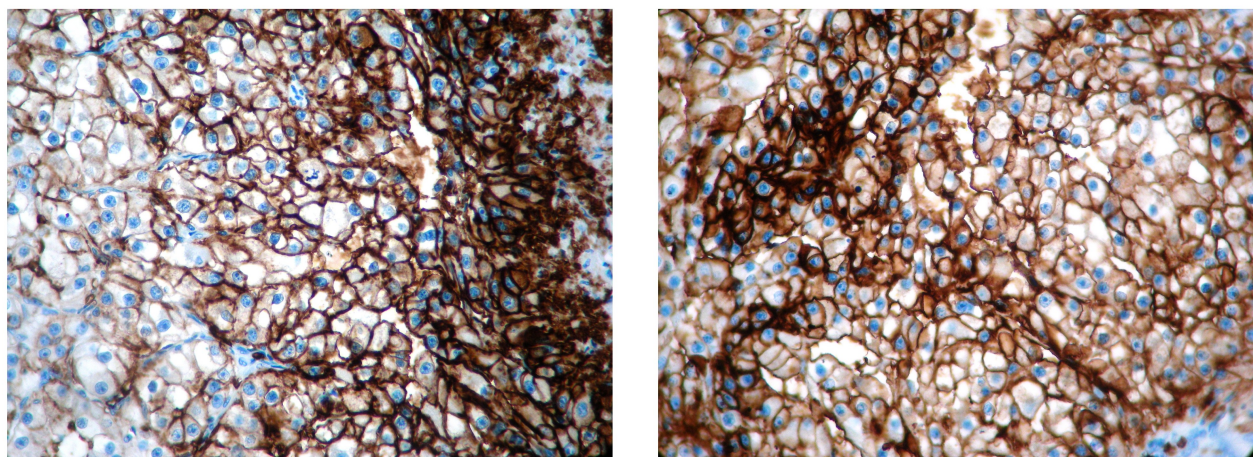
### **Análisis estadístico**

Para contrastar los resultados obtenidos en el ensayo de incorporación de glucosa se realizaron contrastes de Dunnett. Se utilizó el programa SSPS versión 18 para Windows®.

## RESULTADOS

### **EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR DE GLUCOSA (GLUT1) EN TUMORES HUMANOS DE CARCINOMA RENAL CCRcc**

Mediante IHQ se estudió la expresión de GLUT1 en el tejido tumoral de 58 pacientes con CCRcc de los cuales 32 eran hombres y 26 mujeres. Se determinó el porcentaje de expresión tanto a nivel de membrana como de citoplasma determinando el porcentaje de células tumorales marcadas positivamente sobre el total, para cada corte evaluado (Figura 13).



**Figura 13: Fotos representativas de IHQ de tumores CCRcc inmunomarcados para evaluar GLUT1. Imagen izquierda: se observa tinción principalmente a nivel de membrana; Imagen derecha: se observa tinción tanto en membrana plasmática como en el citoplasma. A=200X**

Se determinó que la expresión de GLUT1, tanto a nivel de membrana como de citoplasma no posee distribución normal (Tests de Shapiro-Wilks;  $p < 0,001$  y Kolmogorov Smirnov;  $p < 0,01$ ) por lo que, en los análisis estadísticos realizados, se emplearon tests estadísticos no paramétricos. Se observó que existe correlación significativa entre ellas (Test de Rangos de Spearman;  $r = 0,744$ ;  $p < 0,0001$ ).

No se observó correlación entre la expresión de GLUT1 en citoplasma o membrana y la edad (Test de Rangos de Spearman) ni asociación con el género de los pacientes (Test de MW).

Los valores de expresión se dicotomizaron en “alto” o “bajo” usando  $>50\%$  como valor de corte para la expresión en membrana y  $20\%$  para la expresión en citoplasma. Empleando estos valores de corte se divide el total de casos, aproximadamente, a la mitad. Así, se determinó que 30

(52%) tumores poseen alta expresión de GLUT1 a nivel de membrana mientras que 29 (50%) lo hacen a nivel de citoplasma.

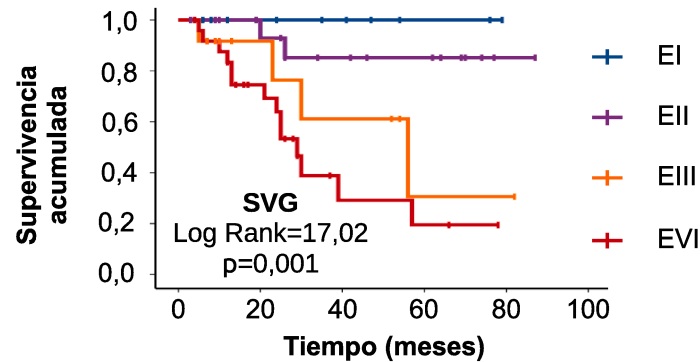
Se estudió la asociación de la expresión de GLUT1 con los parámetros clínico-patológicos relevantes en CCRcc: edad, género, factores de riesgo, *Performance Status* (PS), estadio, grado nuclear (grado Fuhrman), tamaño tumoral y presencia de metástasis al diagnóstico. No se obtuvieron asociaciones significativas para ninguna de las dos localizaciones evaluadas, membrana y citoplasma (Test de  $\chi^2$ ). En la Tabla VIII se detallan los valores p para cada parámetro y localización subcelular estudiados.

Parámetro		Test de $\chi^2$ , valor p	
		GLUT1 Membrana >50%	GLUT1 Citoplasma 20%
Género (n=58)	M F	p=0,41	p=0,60
Edad (n=58)	<60 ≥60	p=0,40	p=0,11
Factores de riesgo (n=49)	No Si	p=0,85	p=0,56
PS (n=51)	0 1 2	p=0,30	p=0,73
Estadio (n=57)	I II III IV	p=0,86	p=0,80
Grado Fuhrman (n=53)	1 2 3 4	p=0,59	p=0,39
Tamaño tumoral (n=57)	1 2 3 4	p=0,96	p=0,92
Metastasis (n=57)	No Si	p=0,71	p=0,85

**Tabla VIII: Asociación entre la expresión de GLUT1 y los parámetros clínico-patológicos evaluados en pacientes con CCRcc. Se listan los valores p obtenidos con un test de  $\chi^2$  empleando un valor de corte del 50% de expresión en membrana y 20% en citoplasma. Cuando la suma para cada categoría no corresponde al total de los pacientes estudiados se debe a que el dato no pudo encontrarse en la revisión de la historia clínica.**

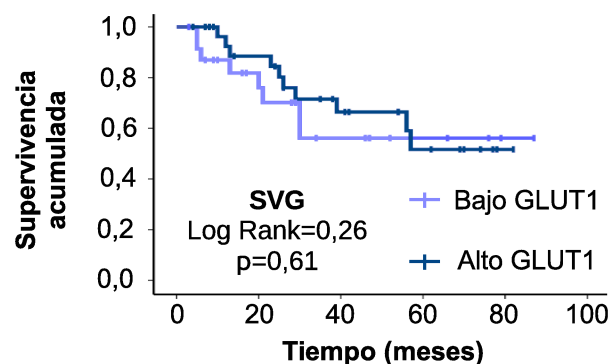
Para evaluar la supervivencia se validó la población en función del estadio, para determinar la representatividad de la cohorte en estudio. La Figura 14 muestra la curva de supervivencia global

(SVG) obtenida para la población estudiada, donde se ve claramente que la supervivencia (de acuerdo a lo esperado) disminuye a medida que aumenta el estadio.



**Figura 14:** Curva de Kaplan Meier obtenida para la SVG en función del E en la población estudiada.

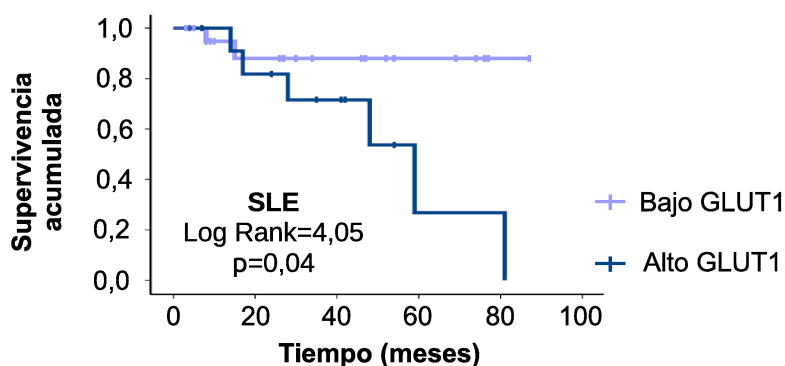
Posteriormente, se evaluó si la expresión de GLUT1 tiene impacto en el pronóstico del paciente CCRcc, analizando tanto la SVG como la supervivencia libre de enfermedad (SLE). No se encontró asociación significativa para ninguna de las supervivencias ni a nivel de membrana ni de citoplasma (Test de Log-Rank). A modo representativo, en la Figura 15, se muestra la curva de SVG para la expresión de GLUT1 a nivel de membrana.



**Figura 15:** Curva de Kaplan Meier obtenida para la SVG en función de la expresión de GLUT1 en membrana utilizando >50% de expresión como valor de corte para dicotomizar los niveles de concentración.

Por último, los valores de expresión de GLUT1, tanto a nivel de membrana como de citoplasma, se dicotomizaron utilizando otros valores de corte (20%, 50% y 70%) y se realizaron los tests estadísticos correspondientes para evaluar si alguno de estos permite obtener mayor

información pronóstica. Solamente, se encontró que, los pacientes con muy alta expresión de GLUT1 a nivel de membrana (mayor o igual al 70%) tienen peor pronóstico en términos de SLE (Test de Log-Rank;  $p=0,04$ ) (Figura 16). El análisis multivariado indicó que esta asociación es independiente del estadio y el grado nuclear, principales factores pronósticos en la patología renal oncológica en estudio (Tests de Regresión de COX;  $p=0,05$ ). Según este modelo, los pacientes con elevada expresión de GLUT1 en membrana poseen un riesgo relativo 9 veces mayor de recaída (Tabla IX).



**Figura 16:** Curva de Kaplan Meier obtenida para la SLE en función de la expresión de GLUT1 en membrana utilizando el 70% como valor de corte para dicotomizar los niveles de expresión.

Variable	Estadístico de WALD	Significancia	Ratio de riesgo de recaída (IC95%)
GLUT1 en membrana $\geq 70\%$ ("alto", "bajo")	3,84	0,05	9,19 (1,00-84,47)
Grado Fuhrman (1,2,3,4)	1,75	0,19	2,67 (0,62-11,39)
Estadio (I, II, III, IV)	0,13	0,72	1,32 (0,29-6,12)

**Tabla IX:** Regresión de COX obtenida para la SLE en función de la expresión de GLUT1 en membrana utilizando el 70% como valor de corte para dicotomizar los niveles de expresión. IC: Intervalo de confianza.

Sin embargo, la expresión elevada de GLUT1 ( $>70\%$ ) en membrana en tumores CCRcc no se asocia con parámetros clínico-patológicos (Test de  $\chi^2$ ) ni tiene impacto en la SVG (Test de Log-Rank).

## **CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN PARCIAL**

Para evaluar el valor del transportador de glucosa, GLUT1, como posible biomarcador tisular en pacientes con CCRcc se estudió, mediante IHQ, su expresión en tejido tumoral y se evaluó su asociación con los parámetros clínico-patológicos y la supervivencia de los pacientes. Si bien GLUT1 se encuentra, principalmente en la membrana de la célula, al tratarse de tumores donde la localización ectópica de una molécula puede tener valor clínico, se consignó además la marcación específica en citoplasma y núcleo.

En primer lugar, los valores de expresión en ambas localizaciones subcelulares se dicotomizaron en “altos” o “bajos” según un valor de corte determinado de manera tal que dividiese la población, aproximadamente, a la mitad. El valor de corte en membrana fue mayor al 50% y en citoplasma del 20%, ya que la mayoría de los tumores tenían una baja expresión de GLUT1 en esta localización.

En citoplasma, el patrón de tinción fue difuso y menos intenso que en membrana. Este patrón ha sido descrito por otros autores (122). En la mayoría de los tumores, no se encontró tinción de GLUT1 en el núcleo de la célula tumoral. En este trabajo, además se encontró que existe una fuerte correlación directa entre la expresión de GLUT1 en membrana y en citoplasma hecho que no ha sido reportado en otros trabajos.

Ozcan *et al.*, realizaron un análisis de la expresión de GLUT1 en tejido tumoral CCRcc, mediante el uso de “*tissue microarray*”, tanto a nivel de membrana como de citoplasma. A diferencia de nuestro trabajo, los autores tomaron el 5% de expresión como valor de corte, con lo que obtuvieron más de un 85% de los casos con expresión positiva para el marcador. Al igual que en nuestro trabajo, los autores tampoco encontraron asociación con el grado nuclear, el estadio o la SVG (122). Esto mismo fue observado por otros autores, en trabajos similares (112,123).

Además, el trabajo de Ozcan *et al.* incluyó no sólo tumores CCRcc sino también otros tipos histológicos de carcinoma renal como CCR papilar y CCRcrb. Ellos determinaron que la expresión de GLUT1 está relacionada con los tumores CCRcc ya que células no tumorales o los tumores CCR papilar o CCRcrb que analizaron, presentaron baja expresión del marcador (122). Liedgren *et al.* también reportaron una diferencia en los niveles de expresión de GLUT1 en tumores CCRcc con respecto a tumores papilar (121). En este trabajo no se evaluó la expresión de GLUT1 en otros tipos histológicos de CCR ni en tumores benignos. Tampoco se consideró en el análisis el tejido no tumoral circundante ya que, consideramos que no es correcto tomar el tejido circundante al tumor como “normal” puesto que podría estar genéticamente alterado a pesar de ser histológicamente normal. La diferencia de expresión de GLUT1 entre los tumores CCRcc y otros tumores CCR podría



explicarse, como se mencionó anteriormente, por la pérdida de función de la proteína Von Hippel-Lindau que presentan los tumores CCRcc (15). Como consecuencia, las células tumorales CCRcc presentan desregulación en vías metabólicas favoreciendo, por ejemplo la sobreexpresión de genes relacionados con la glucólisis como GLUT1 (14,203).

En relación a la expresión de GLUT1 como biomarcador en otras patologías tumorales, Ashton-Sager *et al.* observaron que la expresión de GLUT1 está aumentada en adenocarcinomas endometriales, pero no en la hiperplasia sin atipia (204). También se ha reportado asociación entre la expresión de GLUT1 y la agresividad en carcinoma gástrico (205). En relación a carcinoma colorrectal, no se observó asociación entre GLUT1 y el estadio (113).

En el presente trabajo no se encontraron asociaciones entre la expresión de GLUT1 tisular con parámetros clínico-patológicos ni con las SVG y SLE para ninguna localización subcelular con los valores de corte seleccionados. Sin embargo, se analizó la utilidad de otros valores de corte y se encontró que los tumores con una expresión de GLUT1 a nivel de membrana mayor al 70%, se asociaron con un peor pronóstico en términos de SLE. Esta asociación resultó ser independiente del estadio y del grado nuclear según se demostró mediante el análisis multivariado. Fenske *et al.* obtuvieron resultados similares al analizar la expresión de GLUT1 en adenocarcinoma adrenocortical. Tomando el 10% de expresión como valor de corte observaron que la expresión del marcador está asociada con peor pronóstico en términos de SVG y SLE, en forma independiente del estadio (124). Resultados similares han sido reportados en carcinoma de células escamosas (125) y en cáncer de mama (126). Sin embargo, hasta ahora, no hay bibliografía que describa esta asociación para CCRcc.

En la población estudiada en el presente trabajo, sólo una elevada expresión de GLUT1 se encontró asociada con una mayor probabilidad de recaída. Una posible explicación podría fundamentarse en que, como se dijo anteriormente, la vía de HIF $\alpha$  se encuentra muy activa en estos tumores, generando un fenotipo más agresivo. En este sentido, Liedgren *et al.* reportaron una asociación entre la expresión de GLUT1 y HIF1 $\alpha$  en tumores CCRcc (121). También, Minardi *et al.* observaron una menor SLE en pacientes CCRcc con elevada expresión de HIF1 $\alpha$  (206).

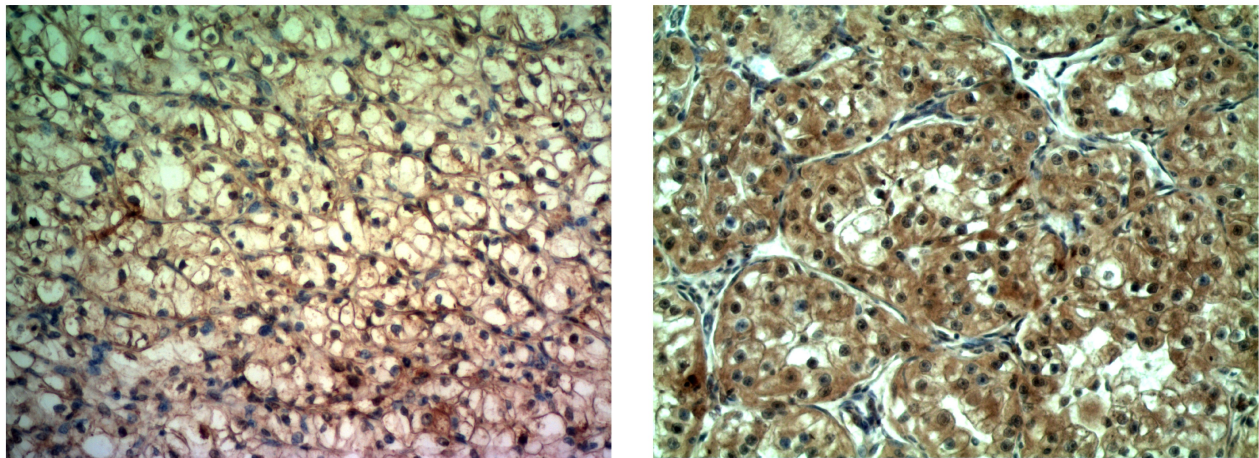
Concluimos que la expresión de GLUT1 tisular podría proponerse como un marcador de mal pronóstico, en términos de recaída, para tumores CCRcc. Futuros estudios en poblaciones con un mayor número de pacientes, provenientes de diferentes centros de diagnóstico, indicarán cual es su verdadero valor de GLUT1 en la clínica de los pacientes con tumores renales.

## **EXPRESIÓN DE LA ANHIDRASA CARBÓNICA IX EN PACIENTES CON CARCINOMA RENAL**

### **CCRcc**

#### **A- CAIX TISULAR**

Mediante IHQ se analizó la expresión de CAIX en el tejido tumoral de 69 pacientes con CCRcc. Se incluyeron 40 hombres y 29 mujeres. Al igual que para la expresión de GLUT1, se determinó el porcentaje de expresión a nivel de membrana y citoplasma como el número de células tumorales marcadas positivamente sobre el total, para cada corte evaluado (Figura 17).



**Figura 17: Fotos representativas de IHQ de tumores CCRcc marcados para evaluar CAIX. La figura de la izquierda muestra tinción principalmente a nivel de membrana, mientras que la de la derecha presenta una fuerte tinción citoplasmática y de membrana. A=200X**

Se determinó que la expresión de CAIX, tanto a nivel de membrana como de citoplasma, no posee distribución normal (Tests de Kolmogorov Smirnov;  $p < 0,05$ ) y que no existe correlación significativa entre ellas (Test de Rangos de Spearman).

Se determinó que la expresión de CAIX tanto en membrana como en citoplasma no se correlaciona con la edad (Test de Rangos de Spearman) ni con el género de los pacientes (Test de MW).

Los valores de expresión se dicotomizaron en “alto” o “bajo” usando  $>50\%$  como valor de corte para la expresión tanto en membrana como en citoplasma. Se obtuvieron 37 (54%) tumores con alta expresión de CAIX a nivel de membrana y 20 (29%) con alta expresión en citoplasma.

Se estudió la asociación con los parámetros clínico-patológicos: edad, género, factores de riesgo, *Performance Status*, estadio, grado nuclear (grado Fuhrman), tamaño tumoral y presencia de metástasis al diagnóstico. Se obtuvo asociación significativa entre la expresión de CAIX a nivel

de membrana y la presencia de metástasis al diagnóstico (Test de  $\chi^2$ ,  $p=0,016$ ). También se encontró asociación significativa entre la expresión de CAIX a nivel de citoplasma y la presencia de factores de riesgo (Test de  $\chi^2$ ;  $p=0,015$ ). En la Tabla X se detallan los valores p para cada parámetro y localización estudiados.

Parámetro		Test de $\chi^2$ , valor p	
		CAIX Membrana >50%	CAIX Citoplasma >50%
Género (n=69)	M F	p=0,79	p=0,75
Edad (n=69)	<60 ≥60	p=0,16	p=0,36
Factores de riesgo (n=59)	No Si	p=0,07	p=0,02*
PS (n=57)	0 1 2	p=0,82	p=0,60
Estadio (n=68)	I II III IV	p=0,09	p=0,06
Grado Fuhrman (n=66)	1 2 3 4	p=0,38	p=0,10
Tamaño tumoral (n=68)	1 2 3 4	p=0,63	p=0,09
Metastasis (n=68)	No Si	p=0,02*	p=0,10

**Tabla X: Asociación entre la expresión de CAIX y los parámetros clínico-patológicos evaluados en pacientes con CCRcc. Se listan los valores p obtenidos con un test de  $\chi^2$  empleando >50% como valor de corte, tanto en membrana como en citoplasma. Cuando la suma para cada categoría no corresponde al total de los pacientes estudiados se debe a que el dato no pudo encontrarse en la revisión de la historia clínica.**

Del análisis de estos resultados, se concluyó que los pacientes que se presentaron con metástasis al diagnóstico tenían, significativamente, menor expresión de CAIX en la membrana de las células tumorales. Utilizando un modelo de regresión logística, se encontró que la expresión de CAIX en membrana puede expresarse en función de M (Regresión logística;  $p=0,019$ ). La Fórmula 1 representa el resultado obtenido. También se encontró que existe un riesgo relativo casi 4 veces menor de presentar M cuando CAIX en membrana es “alto”. La tabla XI resume los resultados obtenidos.

$$pCAIX = \frac{1}{1 + e^{-(0,0534 + 1,296 * M)}}$$

**Fórmula 1:** Modelo que describe la probabilidad de que CAIX se exprese en membrana en función de M obtenido mediante un análisis de regresión logística. pCAIX: probabilidad de expresión de CAIX en membrana.

Variable	Error estándar	Estadístico de WALD	Significancia	Ratio (IC95%)
M ("si", "no")	0,55	4,39	0,019	0,274 (0,09-0,81)
Constante	0,31	3,06	0,080	1,71

**Tabla XI:** Regresión logística realizada para predecir CAIX en membrana a partir de M. IC: Intervalo de confianza.

Se realizó un test para evaluar la bondad de ajuste del modelo. No se obtuvo significancia, probando que el modelo ajusta a lo observado (Prueba de Hosmer y Lemeshow; estadístico de  $\chi^2=0,408$ ;  $p=0,815$ ) (Tabla XII).

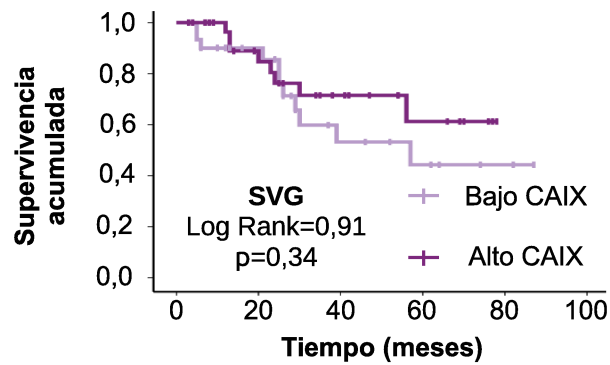
	CAIX=0		CAIX=1		Total
	Observado	Esperado	Observado	Esperado	
M 1	15	14,999	7	7,001	22
M 2	17	17,000	9	29,000	46

**Tabla XII:** Prueba de Hosmer-Lemeshow realizada para evaluar la bondad de ajuste del modelo obtenido mediante regresión logística.

También, los pacientes que presentaban algún factor de riesgo al momento del diagnóstico, presentaron menor expresión de CAIX en el citoplasma de las células tumorales. Sin embargo, al analizar por separado los factores de riesgo más comunes en CCRcc (hipertensión, obesidad y tabaquismo) no se observó asociación significativa con ninguno de ellos en particular (Test de  $\chi^2$ ).

Luego, se evaluó la asociación de la expresión de CAIX, tanto a nivel de membrana como de citoplasma, con la SVG y la SLE. No se encontraron asociaciones significativas (Test de Log-Rank).

A modo representativo, en la Figura 18, se muestra la curva de SVG para la expresión de CAIX a nivel de membrana.



**Figura 18:** Curva de Kaplan Meier para la SVG en función de la expresión de CAIX en membrana utilizando >50% de expresión como valor de corte para dicotomizar los niveles de expresión.

Además, al igual que con GLUT1, se dicotomizaron los valores de expresión tanto a nivel de membrana como de citoplasma utilizando los valores 20%, 50% y 70% y se realizaron los tests estadísticos nuevamente. No se encontraron asociaciones significativas relevantes.

Por último, no se observó correlación significativa (Test de Rangos de Spearman) en los niveles de expresión de CAIX y GLUT1 en tejido tumoral de la población estudiada.

### **B-CAIX EN SUERO (CAIXs)**

Se estudió la expresión de CAIXs en 45 controles sanos (CS), 91 pacientes con CCRcc, 14 pacientes con CCR cromóforo (CCRcrb), variante histológica menos frecuente de CCR, y 20 pacientes con cáncer de mama. En la Tabla XIII se muestran los valores de mediana y rango de CAIXs obtenidos para cada población estudiada.

	n	CAIXs (pg/ml)	
		Mediana	Rango
CS	45	20,64	0-237,71
CCRcc	91	61,53	0-1642,71
CCRcrb	14	21,52	0-120,94
Mama	20	34,85	0-485,87

**Tabla XIII: Mediana y rango de los valores de CAIXs obtenidos para cada población estudiada.**

Al realizar tests de normalidad, se observó que los datos no poseen distribución normal (Tests de Shapiro-Wilk;  $p < 0,0001$  y Kolmogorov Smirnov;  $p < 0,0001$ ). Para los CCRcrb, cuyo  $n > 30$ , el test de Shapiro-Wilk arrojó un  $p = 0,01$ . Por lo tanto y, en donde corresponda, se utilizaron análisis estadísticos no paramétricos.

En primer lugar, se evaluó si existe correlación entre la expresión de CAIXs y el género o la edad de los CS en la población de estudio. Se encontró que las mujeres poseen significativamente mayores niveles de expresión de CAIXs que los hombres (Test de MW;  $p = 0,047$ ) y que la concentración de CAIXs correlaciona débilmente con la edad, los CS de mayor edad, presentan mayores niveles de CAIXs (Test de Rangos Spearman;  $r = 0,338$ ;  $p = 0,023$ ) (Figura 19).

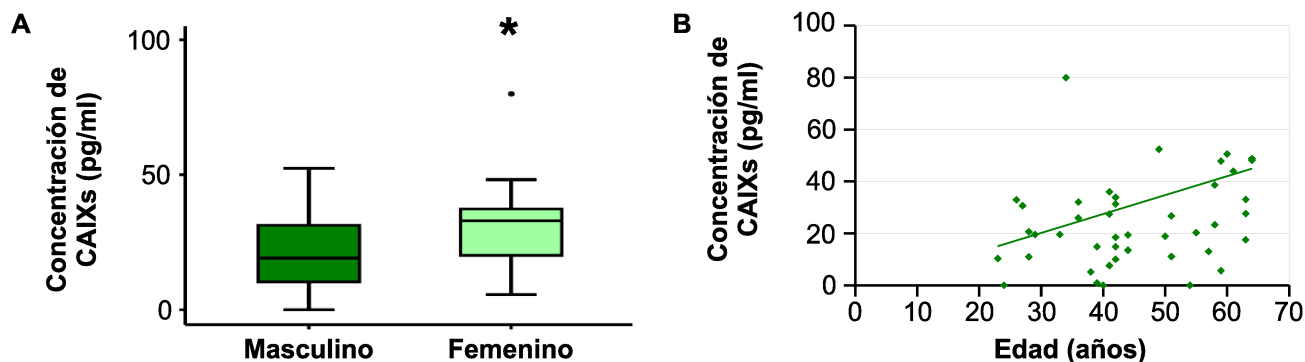


Figura 19: (A) Valores de CAIXs según género de los CS (el círculo representa un valor *outlier*) \*Test de MW,  $p < 0,05$ . (B) Concentración de CAIXs en función de la edad de los CS.

Para estudiar con mayor profundidad la asociación de CAIXs con la edad de los CS se dicotomizó la población sana en aquellos con más de 45 años y aquellos con igual o menor edad. No se obtuvo una diferencia significativa entre los grupos (Test de MW).

Tampoco se obtuvo un resultado significativo al evaluar la correlación tomando el género como factor de confusión (Test de Rangos de Spearman).

Al analizar la población portadora de CCRcc, se observó que los pacientes poseen significativamente mayor concentración de CAIXs que los CS (Test de MW;  $p < 0,0001$ ) (Figura 20).

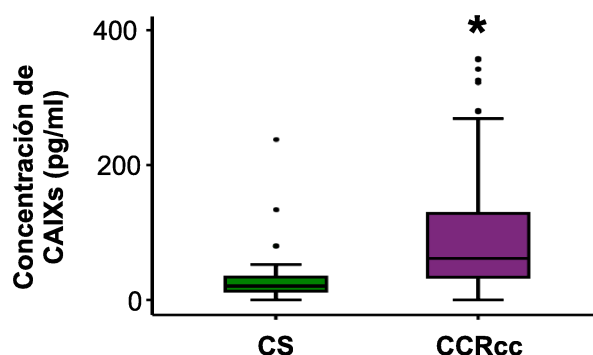


Figura 20: Valores de CAIXs en la población sana y en los pacientes con CCRcc (los círculos representan valores *outliers*). \* Test de MW,  $p < 0,0001$ .

La concentración de CAIXs también correlaciona débilmente con la edad de los pacientes (Test de Rangos de Spearman;  $r = 0,344$ ;  $p = 0,001$ ). Al igual que para los CS, los pacientes de mayor edad, presentan una concentración más alta de CAIXs.

En base a la curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*), se obtuvo un valor de corte de 33,86 pg/ml, correspondiente al percentilo 75 de la población sana, y se calculó la Sensibilidad, Especificidad, Valor Predictivo Positivo (VPP) y Valor Predictivo Negativo (VPN) para CAIXs como biomarcador diagnóstico. La Tabla XIV detalla los valores obtenidos.

Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
74,73%	75,56%	86,08%	59,65%

**Tabla XIV: Valores de Especificidad, Sensibilidad, VPP y VPN para CAIXs como biomarcador diagnóstico en CCRcc.**

Los valores de CAIXs se dicotomizaron en “altos” o “bajos” según este valor de corte. Así, 68 de 91 (75%) pacientes y sólo 11 CS de 45 (24%) mostraron tener valores altos de CAIXs.

Para evaluar posibles asociaciones con los parámetros clínico-patológicos, los valores de CAIXs se dicotomizaron en “altos” o “bajos” utilizando el percentilo 50 de la población enferma (61,53 pg/ml) como valor de corte. Se obtuvo una asociación significativa con el tamaño tumoral, la presencia de metástasis al diagnóstico y el estadio (Test de  $X^2$ :  $p=0,002$ ;  $p=0,02$  y  $p=0,001$ , respectivamente). La Tabla XV resume los resultados obtenidos.



Parámetro		CAIXs Valores altos/Total (%)	Test de $\chi^2$ , valor p
Género (n=91)	M	34/64 (53,1)	p=0,28
	F	11/27 (40,7)	
Edad (n=90)	<60	23/55 (41,8)	p=0,09
	≥60	21/35 (60,0)	
Factores de riesgo (n=86)	No	8/24 (33,3)	p=0,1
	Si	33/62 (53,2)	
PS (n=79)	0	20/52 (38,5)	p=0,12
	1	10/21 (47,6)	
	2	1/2 (50,0)	
	3	4/4 (100,0)	
Estadio (n=91)	I	5/29 (17,2)	p<0,001*
	II	8/14 (57,1)	
	III	11/19 (57,9)	
	IV	21/29 (72,4)	
Grado Fuhrman (n=85)	1	2/4 (50,0)	p=0,71
	2	8/22 (36,4)	
	3	18/36 (50,0)	
	4	12/23 (52,2)	
Tamaño tumoral (n=87)	1	9/37 (24,3)	p=0,002*
	2	11/18 (61,1)	
	3	16/26 (61,5)	
	4	5/6 (83,3)	
Metastasis (n=89)	No	26/64 (40,6)	p=0,02*
	Si	17/25 (68,0)	

**Tabla XV: Parámetros clínico-patológicos estudiados en pacientes con CCRcc. Se listan los valores p obtenidos con un test de  $\chi^2$  empleando el percentilo 50 de los pacientes (61,53 pg/ml) como valor de corte para dicotomizar los datos de concentración. Cuando la suma para cada categoría no corresponde al total de los pacientes estudiados se debe a que el dato no pudo encontrarse en la revisión de la historia clínica.**

Al analizar la expresión de CAIXs dividida según el estadio, se observó una diferencia significativa con respecto a los CS (Figura 21 A) (Test de KW;  $p<0,0001$ ). Sin embargo, los niveles de CAIX de los pacientes E1 no difieren significativamente de los CS (Test de MW), aunque sí difieren de los de estadios más altos en los que se observan mayores concentraciones. Se observó que la correlación de los niveles de CAIXs entre los E, es débil (Test de Tau de Kendall;  $r=0,348$ ;  $p<0,0001$ ).

En el caso del tamaño tumoral, se observó una diferencia significativa de los niveles de CAIXs en todos los T con respecto a los CS (Figura 21 B) (Test de KW;  $p<0,0001$ ). Esta diferencia, incluso se observó para los T más bajos. Los valores de CAIXs son mayores en pacientes con T mayores. La correlación de los niveles de CAIXs entre los E, es débil (Test de Tau de Kendall;  $r=0,359$ ;  $p<0,0001$ ).

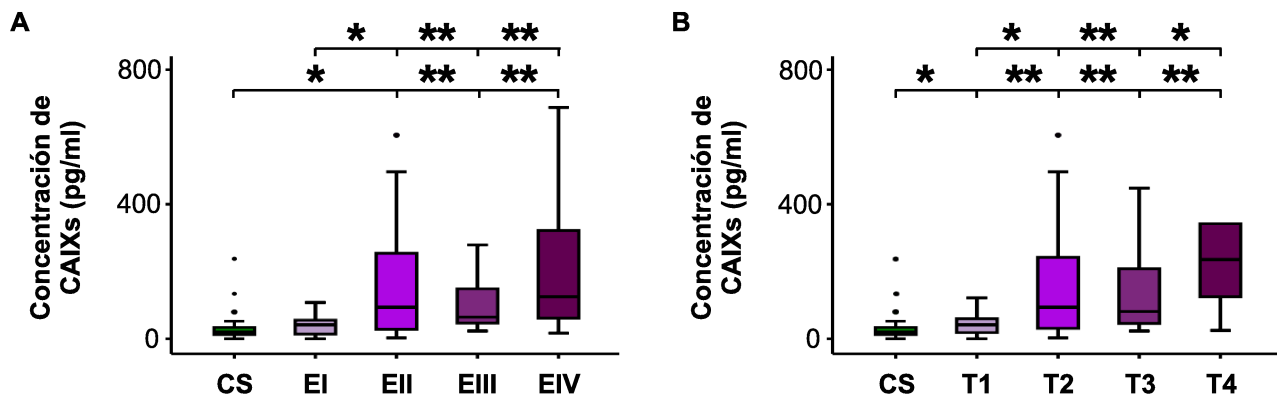


Figura 21: Valores de CAIXs según estadio (A) y tamaño tumoral (B). En cada gráfico se incluyó la población de CS. Los círculos negros representan valores *outliers*. \*\* Test de MW,  $p < 0,0001$ , \* Test de MW,  $p < 0,05$ .

Los pacientes con metástasis al diagnóstico presentaron niveles de CAIXs significativamente elevados respecto de los enfermos sin metástasis (Test de MW,  $p < 0,05$ ).

Al realizar un análisis de regresión logística, se observó que CAIXs puede expresarse en función de T (Regresión Logística;  $p = 0,001$ ) (Tabla XVI).

Variable	Error estándar	Estadístico de WALD	Significancia	Ratio (IC95%)
T (1,2,3,4)	0,25	11,50	0,001	2,294 (1,42-3,71)
Constante	0,54	10,85	0,001	0,167

Tabla XVI: Regresión logística realizada para predecir CAIXs a partir del tamaño tumoral. IC: Intervalo de confianza.

Se realizó la prueba Hosmer-Lemeshow para evaluar la bondad de ajuste del modelo. No se obtuvo significancia, probando que el modelo ajusta a lo observado (Prueba de Hosmer y Lemeshow; estadístico de  $\chi^2 = 2,031$ ;  $p = 0,362$ ).

En forma similar, CAIXs puede expresarse en función de E (Regresión logística;  $p < 0,001$ ) (Tabla XVII).

Variable	Error estándar	Estadístico de WALT	Significancia	Ratio (IC95%)
E (I,II,III,IV)	0,197	11,50	<0,0001	2,166 (1,47-3,19)
Constante	0,56	12,74	<0,0001	0,137

Tabla XVII: Regresión logística realizada para predecir CAIXs a partir del estadio. IC: Intervalo de confianza.

La prueba Hosmer-Lemeshow demuestra que el modelo ajusta a lo observado (Prueba de Hosmer y Lemeshow; estadístico de  $\chi^2=2,541$ ;  $p=0,281$ ).

Al evaluar la SVG, sólo se encontró asociación significativa entre los niveles de CAIXs y la SVG (Test de Log-Rank;  $p=0,02$ ) (Figura 22). Esta asociación es independiente del grado nuclear (Test de Regresión de COX;  $p=0,04$ ), pero pierde la significancia al agregar la variable estadio. Los pacientes con un alto nivel de CAIXs presentan un riesgo relativo 4 veces mayor de fallecer (Tabla XVIII).

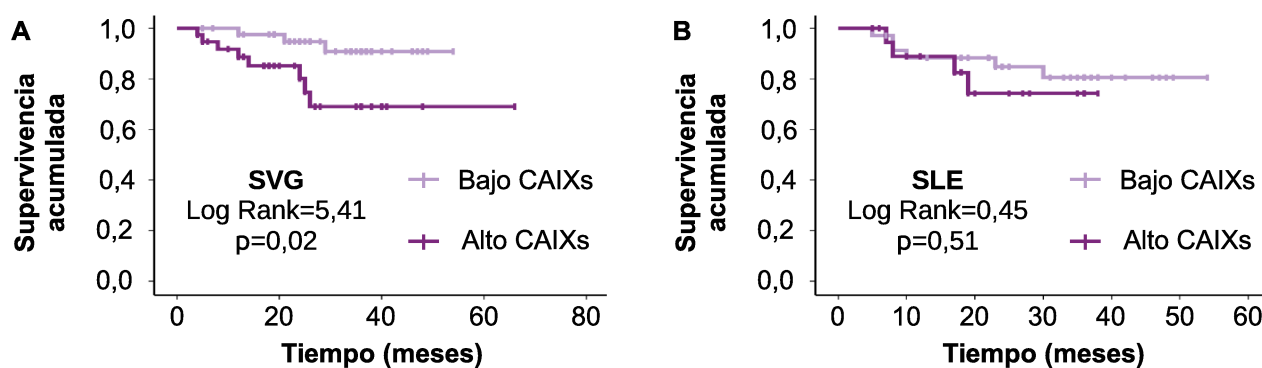
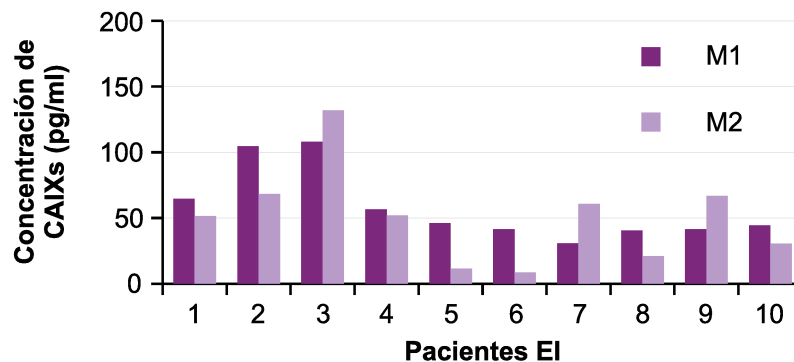


Figura 22: Curvas de Kaplan Meier para (A) SVG y (B) SLE, en función de CAIXs.

Variable	Estadístico de WALT	Significancia	Ratio de riesgo de recaída (IC95%)
CAIXs ("alto", "bajo")	4,39	0,04	4,29 (1,1-16,75)
Grado Fuhrman (1,2,3,4)	0,21	0,65	0,85 (0,43-1,7)

Tabla XVIII: Regresión de COX para SVG en función de CAIXs. IC: Intervalo de confianza.

También, se evaluó la concentración de CAIXs, al menos 3 meses después de la cirugía (M2) y se compararon los resultados con los obtenidos al momento del diagnóstico (M1). Considerando una diferencia  $> 20\%$  o más entre M1 y M2, se observó que en más del 55% de los pacientes, los valores descendieron en la M2, mientras que en el 15% no se modificaron y en un 30% aumentaron. Esto indicaría que, en la mayoría de los pacientes, los niveles de CAIXs descienden al eliminar la masa tumoral. La Figura 23 muestra, como ejemplo, los resultados obtenidos para algunos pacientes EI.



**Figura 23:** Valores de CAIXs en pacientes EI, antes (M1) y después (M2) de la cirugía.

Además, se evaluó si existe asociación entre aquellos pacientes en los que había descendido CAIXs luego de la cirugía y el E o el T mediante un test de  $X^2$ . No se encontraron diferencias significativas lo que indica que el descenso de CAIX luego de la remoción de la masa tumoral no depende del tamaño del tumor o del E.

También se evaluó si existe alguna relación entre el descenso de CAIXs posterior a la cirugía y la supervivencia de los pacientes. No se encontraron asociaciones significativas con la SVG ni la SLE (Test de Log Rank).

En un segundo paso, y teniendo como objetivo evaluar la eficacia de CAIXs como biomarcador diagnóstico de CCRcc, se estudió su concentración en el suero de 14 pacientes con otra patología oncológica renal (CCRcrb) y en 20 pacientes con cáncer de otra localización anatómica (cáncer de mama). En la Figura 24 se observa que los niveles de CAIXs se encuentran aumentados en las pacientes con cáncer de mama con respecto a los CS (Test de MW;  $p=0,027$ ) pero no en los pacientes con CCRcrb. Se observaron diferencias significativas en la concentración de CAIXs entre los pacientes con CCRcc y los pacientes con CCRcrb y con cáncer de mama (Test de MW;  $p=0,001$ ;  $p=0,035$  respectivamente).

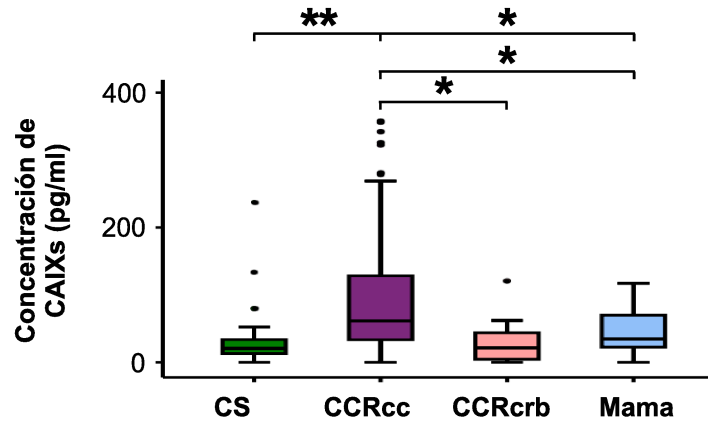


Figura 24: Valores de CAIXs en la población sana y en pacientes con CCRcc, CCRcrb o cáncer de mama. Los círculos negros representan valores *outliers*. \*\* Test de MW,  $p < 0,0001$ , \* Test de MW,  $p < 0,05$ .

En 17 casos, además, se evaluó si existe una posible correlación entre los niveles de CAIXs y su expresión a nivel tisular. Se obtuvo una correlación significativa positiva entre los niveles de CAIXs y su expresión a nivel de citoplasma (Figura 25) (Test de Rangos de Spearman;  $r = 0,740$ ;  $p = 0,001$ ).

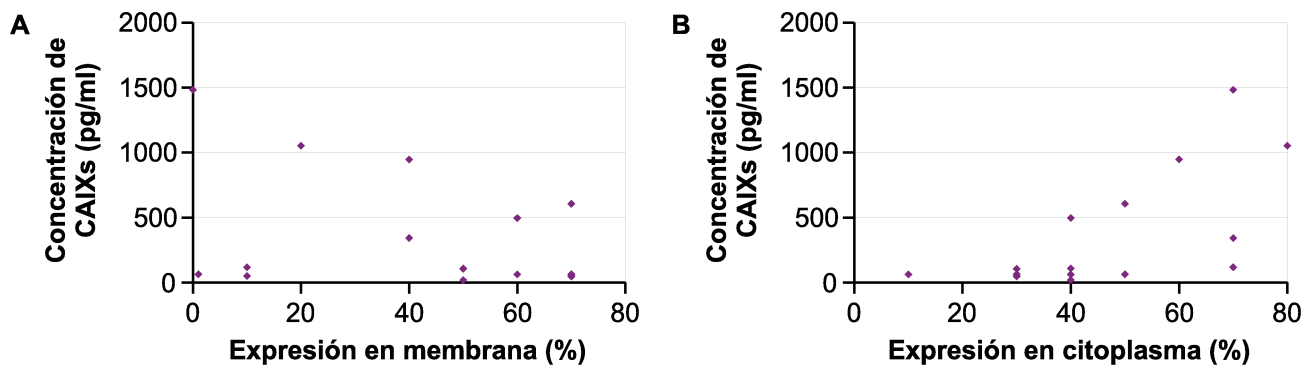
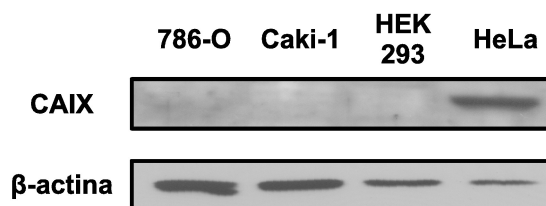


Figura 25: Correlación de los niveles de CAIXs y su expresión a nivel tisular.

A fin de ahondar en el estudio de CAIX y el posible origen de CAIXs se intentó buscar un modelo *in vitro*. Se evaluó la expresión de CAIX en lisados de células de carcinoma renal, 786-O y Caki-1 y, la línea celular renal no tumoral HEK 293, mediante WB. En la Figura 26 se observa que las líneas celulares de riñón no expresan CAIX. Como control positivo se utilizó un lisado de células HeLa, que se conoce expresan la enzima.



**Figura 26:** WB representativo que revela la expresión de CAIX en las líneas estudiadas. Como control de carga se evaluó la expresión de  $\beta$ -actina.

## **CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN PARCIAL**

En una primer instancia, se estudió, mediante IHQ, la expresión de CAIX en tejido tumoral y se evaluó su posible uso como biomarcador tisular en pacientes con CCRcc analizando su asociación con los parámetros clínico-patológicos y la supervivencia de los pacientes. La inmunomarcación se estudió tanto en el citoplasma como en membrana plasmática.

Al igual que en el análisis de GLUT1 tisular, los valores de expresión en ambas localizaciones subcelulares se dicotomizaron en “altos” o “bajos” según un valor de corte determinado de manera tal que dividiese la población aproximadamente a la mitad. Se consideró el 50% como valor de corte, tanto en membrana como en citoplasma. Existen varios trabajos en los cuales los autores tomaron el 85% de expresión de CAIX tisular como valor de corte (77,84,207–211). Sin embargo, en la población estudiada en este trabajo, tomando el 85% como valor de corte, sólo se obtienen 8 pacientes con “alta” expresión de CAIX en membrana y 2 en citoplasma. Es por eso que se utilizó un valor de corte más bajo, ya que no es adecuado realizar un análisis de datos en el que se cuenta con sólo 2 pacientes en un grupo. Probablemente, con un n mayor, se podrá obtener un número de pacientes más alto en cada grupo que permita realizar un análisis estadístico con el valor de corte reportado en bibliografía. De todas formas, como la técnica de IHQ no está estandarizada, la diferencia en la expresión con otros grupos de investigación podría adjudicarse a diferencias en la metodología empleada, incluyendo las características del anticuerpo y la dilución usada. Otro problema es que la IHQ es una técnica semicuantitativa y tomar un valor de corte del 85%, da un margen poco certero para definir valores bajos de valores altos de tinción.

El patrón de inmunomarcación fue definido a nivel de membrana plasmática y difuso en citoplasma. A diferencia de GLUT1, no se observó correlación entre los niveles de expresión de CAIX en membrana y en citoplasma. En un trabajo realizado en cáncer de pulmón, tampoco encontraron correlación entre ambas localizaciones de CAIX aunque sí encontraron asociación entre la marcación en membrana con la expresión perinuclear (212). En los cortes de CCRcc incluidos en el presente estudio, no se observó expresión perinuclear.

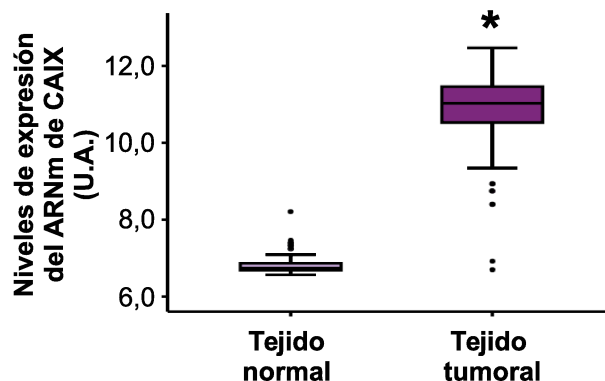
Al evaluar la asociación entre la expresión de CAIX, en ambas localizaciones subcelulares, con los parámetros clínico-patológicos, se encontró una asociación significativa entre la expresión de CAIX en citoplasma y los factores de riesgo. En este sentido, los pacientes que presentaron algún factor de riesgo (hipertensión arterial, tabaquismo u obesidad) al momento del diagnóstico, tenían significativamente menor expresión de CAIX en el citoplasma de las células tumorales. Se analizaron luego los factores de riesgo en forma individual y no se observó asociación significativa con ninguno de ellos en particular, debido tal vez, a que el número de pacientes para cada factor de

riesgo es pequeño. Quizá sería necesario aumentar el n para obtener resultados concluyentes. En el trabajo de Swinson *et al.* tampoco se encontró asociación entre la expresión de CAIX en citoplasma y otros parámetros clínico-patológicos en otra patología tumoral como el cáncer de pulmón (212).

Por otro lado, en el presente trabajo, se encontró una asociación significativa entre los niveles de expresión de CAIX en membrana y la presencia de metástasis al diagnóstico. Los pacientes que se presentaron con metástasis al diagnóstico tenían, significativamente, menores niveles de CAIX en la membrana de las células tumorales. Al realizar un análisis de regresión logística, se encontró que esta asociación es fuerte puesto que, no sólo se pudo encontrar un modelo para representar la probabilidad de que CAIX se exprese en membrana en función de M, sino que también, mediante la prueba de Hosmer y Lemeshow, se encontró que el modelo predecía muy bien los resultados. A su vez, fue posible determinar que el riesgo de presentar metástasis al diagnóstico es cuatro veces mayor para los pacientes con baja expresión de CAIX en las células tumorales. Por otra parte, Leibovich *et al.* encontraron que la baja expresión de CAIX en membrana se asoció con los datos clínico-patológicos como síntomas al diagnóstico y con parámetros de mal pronóstico como grado nuclear avanzado y diferenciación sarcomatoide (tumores que presentan alto nivel de dediferenciación celular). Sin embargo, no reportan asociación con la presencia de metástasis al diagnóstico (209). En conjunto, todos estos resultados asocian la baja expresión de CAIX en membrana con factores de mala evolución en pacientes con CCRcc. Los autores también estudiaron los niveles de expresión de CAIX en otros tipos histológicos de CCR y en tejido normal y, encontraron que, los tumores CCRcc, presentaban significativamente mayores niveles de expresión de CAIX con respecto a los CCRcrb y los CCR papilar y que el tejido normal no expresa CAIX. Esto mismo fue descrito por Sandlund *et al.* (160). Según estos resultados, serían los tumores CCRcc, que poseen alteración en la vía de HIF $\alpha$ , los que expresan mayores niveles de CAIX.

Si bien, en este trabajo no se evaluó la expresión de CAIX en tejido sano, se realizó una búsqueda en distintas bases de datos públicas y mediante el análisis de una base de datos de microarray de CCRcc, se encontró que los niveles de ARNm de CAIX en células tumorales difieren significativamente respecto de células no tumorales (Figura 27) (Test de MW,  $p < 0,0001$ ) (213). Este estudio se llevó a cabo en 101 pacientes con CCRcc en República Checa y se utilizó un microarray basado en la tecnología Illumina®. Los datos no poseen distribución normal (Test de Kolmogorov-Smirnov,  $p < 0,0001$ ). A pesar de que no es correcto sacar conclusiones sobre la expresión de una proteína en base al análisis de los niveles del ARNm, el hecho de que éste aumente en tejido tumoral indica que existe una regulación diferencial de su transcripción en las células tumorales.





**Figura 27: Niveles de expresión del ARNm de CAIX en tejido normal y en tejido tumoral de pacientes con CCRcc (los círculos representan valores *outliers*).**

Bui *et al.* también analizaron los niveles de expresión de CAIX en metástasis resecadas y los compararon con la expresión en el tumor CCRcc primario. Los autores reportaron que, en el mismo paciente, las metástasis exhiben menor expresión de CAIX con respecto a las células del tumor primario (77). En función de los resultados reportados en la bibliografía, es posible concluir que, si bien la célula CCRcc del tumor primario, expresa altos niveles de CAIX en membrana. Una posibilidad, que merece ser estudiada, es si la célula que es capaz de migrar y metastatizar expresa significativamente menos CAIX en membrana, como consecuencia de la inestabilidad genética y la presión de selección clonal a las que está sometida. Esto puede vincularse con nuestros resultados, en el sentido de que la menor expresión de CAIX en membrana se asocia a la presencia de metástasis. Sin embargo, Cimino-Mathews *et al.* reportaron que la inmunomarcación positiva para CAIX permite identificar las metástasis de CCRcc en tiroides para diferenciarlas de los tumores primarios en la glándula (214). Es probable que el patrón de tinción en diferentes órganos esté condicionado por la estirpe tumoral y el microambiente particular.

A continuación, en este trabajo, se estudió la asociación entre la inmunomarcación de CAIX y la supervivencia. No se encontraron asociaciones significativas ni con la SVG ni con la SLE. Tampoco se encontraron asociaciones cuando se utilizaron otros valores de corte (20%, 50%, 70%). Con estos resultados es posible concluir que, en la cohorte de pacientes CCRcc estudiada, la expresión de CAIX tisular no posee valor pronóstico.

Otros autores observaron que los pacientes CCRcc que presentaban metástasis al momento del diagnóstico, exhibieron baja expresión de CAIX en la membrana del tumor primario y tuvieron peor pronóstico en términos de SVG (77,84,208). En otros trabajos se describió la misma tendencia estudiando la población entera, incluyendo pacientes metastásicos y no metastásicos

(209,211). En base a estas evidencias, estudiamos la SVG en los pacientes CCRcc EIV que presentaron metástasis al diagnóstico en función de la expresión de CAIX en membrana con el valor de corte utilizado en este trabajo (>50%). No encontramos asociación significativa con la SVG (Test de Log-Rank).

Curiosamente, una alta expresión de CAIX en membrana se asoció con peor pronóstico en términos de SVG o SLE en otros tumores como de cérvix, mama y sarcoma de partes blandas (215–217).

Por último, a nivel tisular, no se encontró correlación entre la expresión de GLUT1 y CAIX en membrana o en citoplasma en la población estudiada. Si bien en la literatura no hay reportes de correlación entre estas moléculas en CCRcc, sí encontró en otros tumores (218–220).

En resumen, una baja expresión de CAIX en membrana de las células tumorales, se asoció con la presencia de metástasis al diagnóstico pero no con otros parámetros clínico-patológicos ni con la SVG o SLE.

Por otro lado, estudiamos la expresión de CAIX en el suero (CAIXs) de pacientes con CCRcc. También se analizó el suero de controles sanos para comparar los resultados y evaluar el valor de CAIXs como biomarcador diagnóstico. La mediana de la concentración de CAIXs para esta población con CCRcc fue similar a la observada por otros autores en otras poblaciones (221,222). Además, los niveles de CAIXs fueron significativamente mayores en pacientes con CCRcc con respecto a los CS. Esto fue descrito por otros autores que estudiaron tanto pacientes con CCRcc (222) como con otros cánceres (223).

Es importante mencionar que, en la población sana, se observó que la concentración de CAIX correlaciona débilmente con el género y la edad presentando mayores niveles de la enzima las mujeres y las personas de mayor edad. También, en los pacientes CCRcc, los niveles de CAIX correlacionaron débilmente con la edad pero no con el género. Esta correlación no ha sido reportada por otros autores y presenta un problema desde el punto de vista de que la población sana con la que contamos, es más joven que la enferma. Podría pensarse que el aumento en los niveles de CAIXs en los pacientes se debe a que pertenecen a un rango etario mayor. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, muchos otros autores observaron este aumento aún cuando el rango etario de los CS era similar al de los enfermos. Por otro lado, otros autores observaron un aumento de CAIXs sérica en pacientes CCRcc respecto a población sana equiparada por edad. Se proyecta realizar estudios de validación de los resultados obtenidos en esta tesis con pacientes y controles de similar rango etario.

Utilizando un valor de corte del 33,86 pg/ml, correspondiente al percentilo 75 de la población total, CAIXs mostró una elevada Sensibilidad y Especificidad (~ 75% para ambas). Estos valores fueron similares a los reportados por Li *et al.* (222). En otro trabajo en pacientes con cáncer de pulmón se obtuvieron valores de Sensibilidad y Especificidad más elevados para CAIXs (>90%) (223).

Se dicotomizó la población enferma según si presentaban “alta” o “baja” expresión de CAIX, utilizando el percentilo 50 de la población enferma, como valor de corte. Se observó una asociación significativa con el tamaño tumoral (T), el estadio (E) y la metástasis. Los pacientes con enfermedad metastásica presentaron mayores niveles de CAIXs. Además, la concentración de CAIXs aumenta con el T y el E de manera que, los pacientes con mayores concentraciones de CAIXs exhiben tumores de mayor tamaño y estadios más avanzados. Los resultados obtenidos para T y E, además se analizaron en profundidad mediante una regresión logística, que indicó que la asociación es fuerte puesto que el modelo propuesto se ajusta a lo observado. Considerando que los niveles de CAIXs aumentan significativamente desde incluso, tumores T1, podría recomendarse su medición aún cuando el tamaño tumoral sea pequeño, punto que deberá ser validado en estudios posteriores. En este sentido, Zhou *et al.* también observaron correlación entre los valores de CAIXs y el tamaño tumoral (221).

También, en el presente trabajo se evaluó la expresión de CAIXs en otro tipo histológico de CCR, CCRcrb, y en otro tipo tumoral como es cáncer de mama. Se observó que los niveles de CAIXs son mayores en pacientes con CCRcc con respecto a aquellos con CCRcrb. Esto mismo fue observado por otros investigadores (222). Esta diferencia podría explicarse por la alteración en la vía de HIF $\alpha$  característica de los tumores CCRcc. Por otro lado, los niveles de CAIXs también se encuentran significativamente elevados en pacientes con cáncer de mama, aunque no difieren de los pacientes CCRcc. Por lo tanto, teniendo en cuenta toda esta información, es posible concluir, que el aumento en los niveles de CAIXs no estaría sólo asociado a los tumores CCRcc. Es interesante ampliar este estudio a otros tipos tumorales, para determinar en qué cánceres CAIXs está aumentado.

En relación a la supervivencia, nosotros determinamos que los niveles de CAIXs altos se asocian con peor SVG, aunque no tienen relación con la SLE. Mediante el análisis de correlación de COX, se observó que esta asociación es independiente del grado nuclear pero no del estadio. El test, además determinó que los pacientes con CAIXs elevada presentan un riesgo cuatro veces mayor de fallecer por la portación del tumor que los que poseen baja expresión de CAIXs. Li *et al.* analizaron los niveles de CAIXs, mediante test de ELISA, y reportaron que los pacientes con

valores más altos de CAIXs tuvieron menor SLE. Sin embargo, estos autores no realizaron estudios multivariados para corroborar la independencia de las variables analizadas (222).

Los resultados obtenidos por nuestro grupo motivaron a estudiar qué sucede con los valores de CAIXs luego de la remoción del tumor. Encontramos que los niveles de CAIXs descienden significativamente luego de la cirugía en más de un 55% de los pacientes. Esto mismo fue observado por Závada et al., quienes realizaron un estudio con suero y orina en 50 pacientes con CCR (224).

Posteriormente, decidimos evaluar si existe correlación entre la concentración de CAIXs y su expresión, tanto en membrana como en citoplasma en una población de 17 pacientes de los que se tenía el dato de expresión de CAIX tanto en el tejido tumoral como en el suero. Se observó una correlación positiva significativa entre los niveles de CAIXs y la expresión en citoplasma y una tendencia a una correlación inversa con la expresión en membrana, aunque no significativa. Por lo tanto, parecía ser que, a medida que la expresión en citoplasma de las células tumorales aumenta y, en membrana tiende a disminuir, aumentan los niveles de CAIXs.

En resumen en tumores CCRcc pequeños, CAIX se expresa principalmente en membrana y los niveles circulantes son bajos. A medida que el tamaño tumoral (o el estadio) aumenta, los niveles de CAIX aumentan en citoplasma y en circulación, pero disminuyen en membrana. Incluso, pacientes que presentaron metástasis al diagnóstico exhiben significativamente menores niveles de CAIX en la membrana de las células tumorales. Podría especularse que, a medida que la enfermedad CCRcc progresa, ocurre un cambio en la síntesis de la proteína CAIX que la estimule a ser secretada. En este modelo, los niveles en citoplasma se incrementan, debido a que aumenta su transcripción pero desaparece en membrana y es detectada en circulación.

Otro modelo que podría postularse, involucra al microambiente tumoral en donde se encuentran una gran cantidad de enzimas proteolíticas. En particular fue descripto que la familia de enzimas más involucradas en el proceso invasivo, las metaloproteasas, son capaces de clivar la porción extracelular de CAIX facilitando la liberación de CAIX soluble (225). Si esta hipótesis es correcta, CAIX se encontraría sobreexpresada en los tumores CCRcc, pero debido a la actividad enzimática tumoral, el dominio extracelular de la molécula sería clivado, se solubilizaría e iría a circulación, explicando sus altos niveles en sangre. En base a este modelo, el aumento de la proteína en citoplasma también podría explicarse por un aumento en su transcripción pero ya no se considera un cambio en el procesamiento de la proteína CAIX sino que ésta seguiría su ruta normal hacia la membrana de la célula tumoral pero sería mayoritariamente clivada y liberada a circulación a causa del aumento en la actividad enzimática del microambiente tumoral.

Por último, a fin de encontrar un modelo *in vitro* para estudiar el rol de CAIX se evaluó su expresión en líneas celulares humanas de CCRcc con distinto *background* genético [786-O (VHL<sup>-/-</sup>) y Caki-1 (VHL<sup>+/+</sup>)] y células control HEK 293 derivadas de riñón de embrión humano. No se observó expresión detectable de CAIX, mediante WB, en ninguna de las líneas de riñón, pero si en las células control HeLa. En otros trabajos se reportó la ausencia de expresión de CAIX en células 786-O y Caki-1 en condiciones de normoxia (143,226). Esto se debe a que, si bien ambas líneas derivan de CCRcc, y sobreexpresan HIF $\alpha$ , cada línea expresa distintas isoformas de la proteína. A su vez, es esperable que las células HEK 293 no expresen la proteína CAIX puesto no poseen alteraciones en la vía HIF $\alpha$ . Por otro lado, los niveles de CAIX se relacionan con la concentración de O<sub>2</sub>. En este sentido, las células 786-O expresan sólo HIF2 $\alpha$  en condiciones de normoxia y sus niveles aumentan en condiciones de hipoxia, pero no expresan HIF1 $\alpha$ . Raval *et al.* demostraron que la sobreexpresión de HIF1 $\alpha$  en células 786-O induce la expresión de CAIX, indicando que la expresión de esta proteína estaría regulada por la isoforma 1 $\alpha$  de HIF (226). La expresión de HIF $\alpha$  en condiciones de normoxia en células Caki-1 es menos conocida, pero se sabe que en condiciones de hipoxia expresan ambas isoformas HIF1 $\alpha$  y HIF1 $\beta$ . Es por esto que, para estudiar la regulación de CAIX en estas líneas celulares de CCRcc sería interesante someterlas a condiciones de hipoxia y evaluar su expresión.

### **EXPRESIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO 21 EN SUERO (FGF21s) DE PACIENTES CON CCRcc**

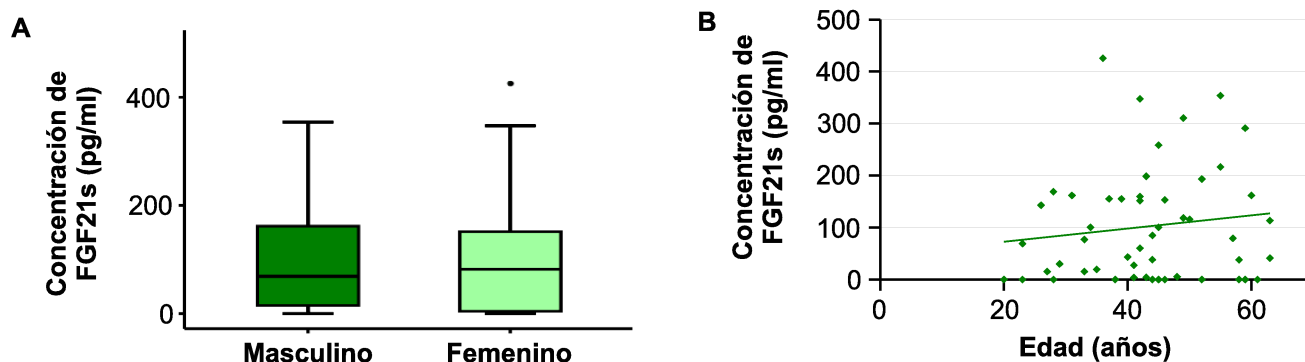
Se estudió la expresión de FGF21s, mediante test de ELISA, en 51 CS, 98 pacientes con CCRcc, 14 pacientes con CCRcrb y 45 pacientes con cáncer de mama. En la Tabla XIX se muestran los valores de mediana y rango de FGF21s obtenidos para cada población estudiada.

		FGF21s (pg/ml)	
	n	Mediana	Rango
CS	51	76,86	0-425,60
CCRcc	98	219,57	28,55-2224,88
CCRcrb	14	306,81	45,46-1912,40
Mama	45	226,61	28,41-780,45

**Tabla XIX: Mediana y rango de los valores de FGF21s obtenidos para cada población estudiada.**

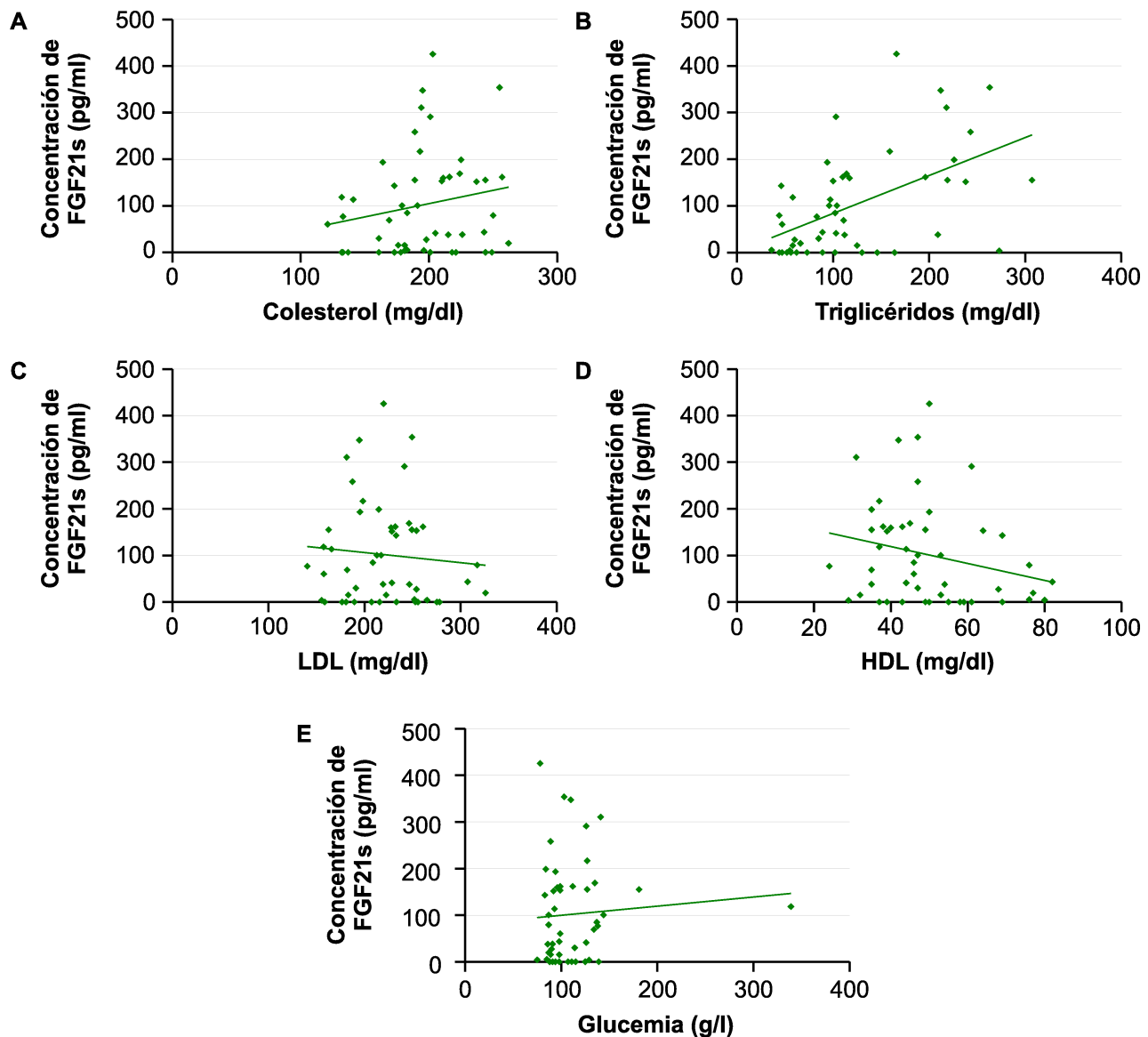
Se determinó que la expresión de FGF21s, no posee distribución normal (Tests de Shapiro-Wilk;  $p < 0,0001$  y Kolmogorov Smirnov;  $p < 0,05$ ). Para los CCRcrb ( $n > 30$ ) el test de Shapiro-Wilk arrojó un  $p < 0,0001$ . Por lo tanto, en los análisis estadísticos realizados se emplearon tests estadísticos no paramétricos.

Como existen pocos trabajos en los que se hubiesen estudiado los niveles de FGF21s en humanos, el primer análisis consistió en evaluar su expresión en la población sana y su asociación con la edad y el género para descartar variaciones indeseadas. No se observó asociación entre la concentración de FGF21s y el género de los CS (Test de MW) o la edad (Test de Rangos de Spearman) (Figura 28). También, se dicotomizó la edad de los CS en 2 categorías, aquellos con 60 años o más y aquellos menores a 60 años al momento de la extracción de la muestra 1 (M1) tampoco se observaron diferencias significativas de concentración de FGF21s entre estos grupos (Test de MW).



**Figura 28: (A) Valores de FGF21s según el género de los CS (el círculo representa un valor *outlier*). (B) Concentración de FGF21s en función de la edad de los CS.**

Como FGF21 está asociado con el estrés hepático y es capaz de regular la concentración de lípidos, glucosa y el metabolismo energético, tanto en circulación como en el hígado, se analizó si en la población sana, existe asociación entre FGF21s y el perfil lipídico circulante (colesterol, triglicéridos, HDL y LDL) o la glucemia. Sólo se observó correlación positiva entre los niveles de FGF21s y la concentración de triglicéridos (Test de Rangos de Spearman;  $r=0,5$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 29) (Tabla XX).



**Figura 29:** Concentración de FGF21s en función de los valores de (A) colesterol, (B) triglicéridos, (C) LDL, (D) HDL y (E) glucemia medidos en la población sana.

A su vez, como la hormona Leptina está involucrada en el almacenamiento y consumo de ácidos grasos y existen evidencias de una relación entre ésta y los niveles de FGF21s, se analizó su concentración en suero, medido también mediante el método ELISA, y su asociación con FGF21s. No se encontró ninguna correlación entre ellas (Test de Rangos Spearman, NS) (Figura 30) (Tabla XX).



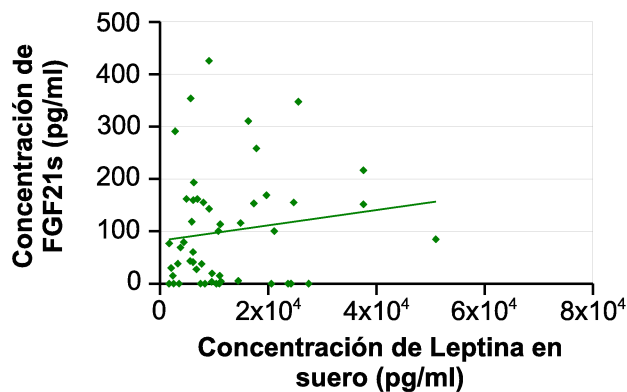
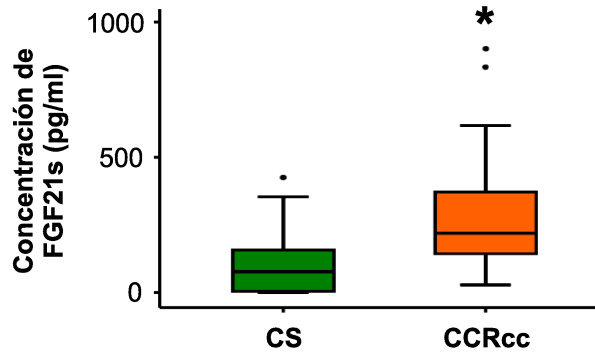


Figura 30: Concentración de FGF21s en función de la concentración de Leptina en la población sana.

Variable	Concentración de FGF21s	
	Test de Spearman	Valor p
Colesterol	0,214	0,14
Triglicéridos	0,501	<0,01*
LDL	-0,067	0,65
HDL	-0,260	0,07
Glucemia	0,120	0,40
Leptina	0,106	0,46

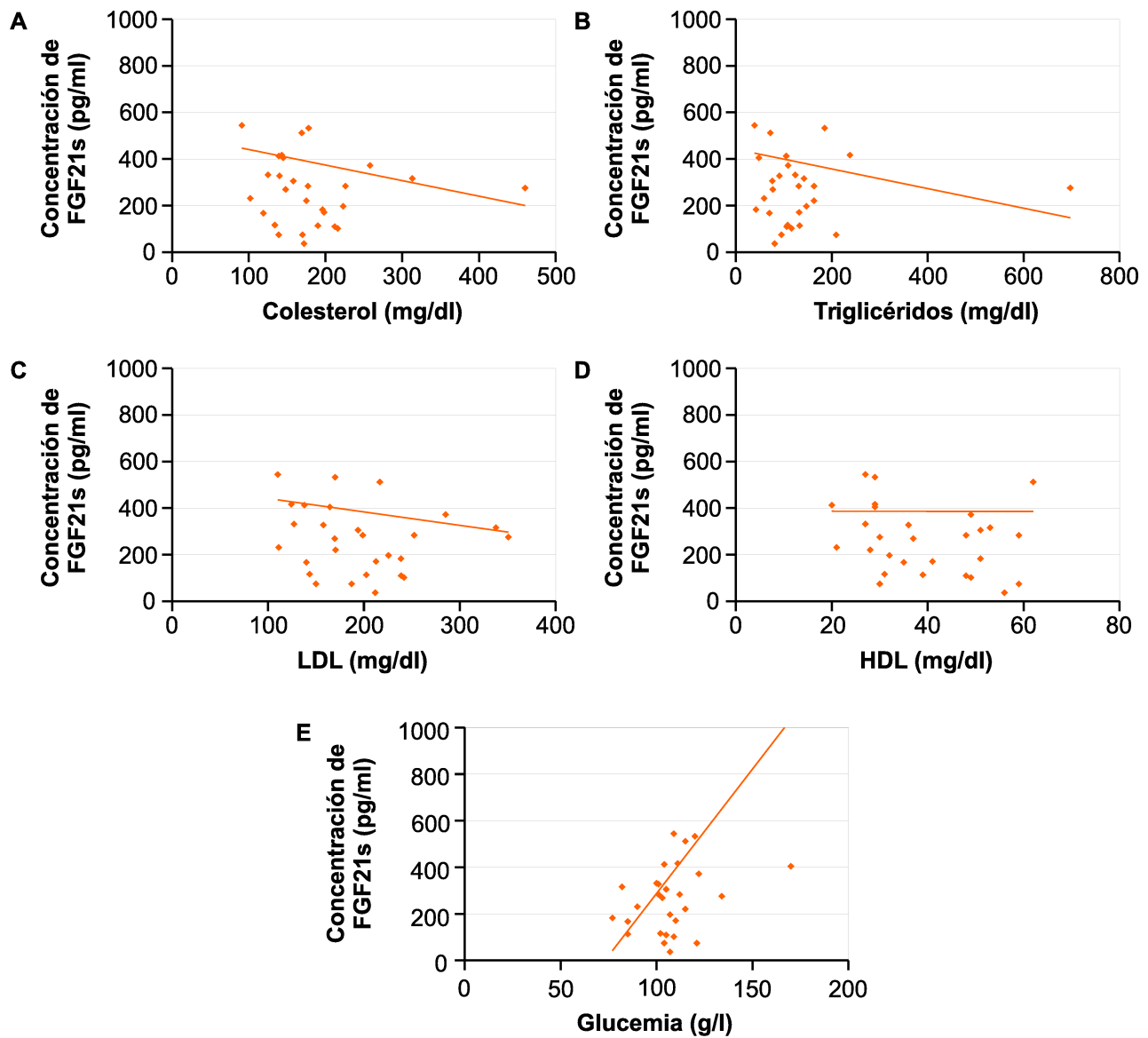
Tabla XX: Correlación entre los niveles de FGF21s y el perfil lipídico, la glucemia y la concentración de Leptina en el suero de la población sana. Se muestra coeficiente del test de Spearman y el valor p.

Se estudió, entonces, la asociación entre los valores de FGF21s de los CS y los pacientes con CCRcc. En la Figura 31 se observa que los valores de FGF21s son significativamente más altos en la población de pacientes con CCRcc que en la control (Test de KW;  $p < 0,0001$ ).



**Figura 31: Valores de FGF21s en la población sana y en los pacientes con CCRcc (los círculos representan valores *outliers*). \* Test de MW,  $p < 0,0001$ .**

Al igual que la población sana, los pacientes con CCRcc no presentaron correlaciones significativas entre los valores de FGF21s y la edad, el género, la glucemia y la concentración de colesterol, LDL, HDL y Leptina. Sin embargo, a diferencia de los CS no se observó correlación con la concentración de triglicéridos (Test de Rangos de Spearman) (Figuras 32 y 33) (Tabla XXI). También, se realizó un test no paramétrico adicional en el que no se observó asociación significativa entre los valores de triglicéridos de la población control y la de pacientes (Test de MW).



**Figura 32:** Concentración de FGF21s en función de los valores de (A) colesterol, (B) triglicéridos, (C) LDL, (D) HDL y (E) glucemia medidos en pacientes con CCRcc.

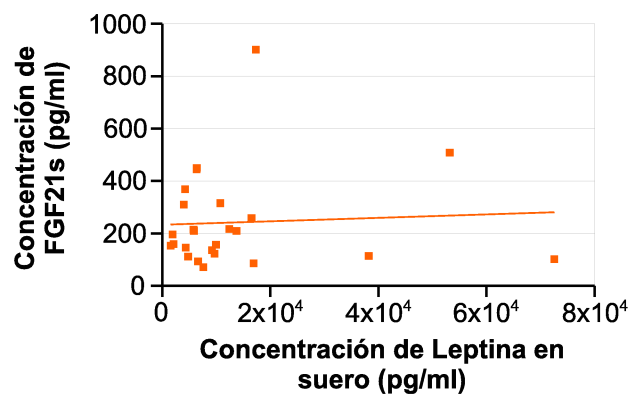
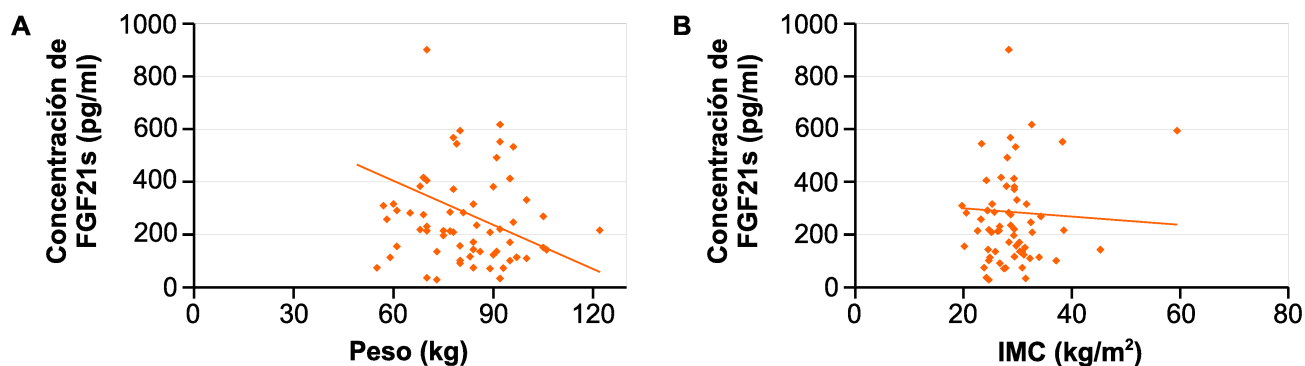


Figura 33: Concentración de FGF21s en función de la concentración de Leptina en pacientes con CCRcc.

Variable	Concentración de FGF21s	
	Test de Spearman	Valor p
Colesterol	-0,176	0,35
Triglicéridos	-0,144	0,45
LDL	-0,204	0,28
HDL	-0,258	0,18
Glucemia	3,55	0,06
Leptina	-0,017	0,94

Tabla XXI: Correlación entre los niveles de FGF21s y el perfil lipídico, la glucemia y la concentración de Leptina en el suero de los pacientes con CCRcc. Se muestra coeficiente del test de Spearman y el valor p.

Tampoco se observó correlación entre FGF21s con el peso o el índice de masa corporal (IMC) de los pacientes (Test de Rangos de Spearman) (Figura 34).



**Figura 34: Concentración de FGF21s en función de (A) el peso y (B) el índice de masa corporal de los pacientes con CCRcc.**

Además, se evaluó la función renal de los pacientes para descartar que los niveles altos de FGF21s se debieran a una alteración en el *clearance* de esa molécula y no a la presencia del tumor en sí. Para esto se calculó el valor de *clearance* de creatinina, según se especifica en “Materiales y Métodos”, y se dicotomizaron los valores en “normal” o “alto” para aquellos con disfunción renal. El 87% de los pacientes presentó una función normal renal. No se halló asociación significativa entre la función renal y los niveles de FGF21s (Test de  $X^2$ ).

Utilizando la curva ROC se determinó un valor de corte de 130,64 pg/ml, correspondiente al percentilo 65 de la población control, para optimizar la especificidad y la sensibilidad. Los valores de FGF21s se dicotomizaron en “altos” o “bajos” según este valor de corte resultando en 79 de 98 (81%) pacientes con valores altos de FGF21s y solo 18 CS de 51 (35%). En la Tabla XXII se detallan los valores de Especificidad y Sensibilidad, VPP y VPN para FGF21s como biomarcador diagnóstico.

Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
80,61%	64,71%	81,44%	63,46%

**Tabla XXII: Valores de Especificidad, Sensibilidad, VPP y VPN para FGF21s como biomarcador diagnóstico para CCRcc.**

Para evaluar las posibles asociaciones entre los niveles de FGF21s y los parámetros clínico-patológicos, nuevamente se dicotomizaron los valores de FGF21s de los pacientes con CCRcc en “alto” o “bajo” utilizando un nuevo valor de corte, que en este caso fue de 219,57 pg/ml correspondiente al percentilo 50 de la población enferma.

No se hallaron diferencias significativas entre los parámetros clínico-patológicos y los niveles de FGF21s (Test de  $\chi^2$ ). Los parámetros estudiados fueron: edad, género, obesidad, existencia de algún factor de riesgo al diagnóstico (tabaquismo, obesidad e hipertensión arterial), performance status (PS) al diagnóstico, estadio, grado nuclear, tamaño tumoral y presencia de metástasis al diagnóstico (M). Tampoco se obtuvieron diferencias significativas con los valores de triglicéridos dicotomizados en “normal” o “alto” según el valor de corte de 200 mg/dl utilizado en la clínica (Test de  $\chi^2$ ) (Tabla XXIII).

Parámetro		FGF21s Valores altos/Total (%)	Test de $\chi^2$ , valor p
Género (n=98)	M	33/70 (47,1)	p=0,27
	F	16/28 (57,1)	
Edad (n=98)	<60	24/48 (50,0)	p=1,00
	≥60	25/50 (50,0)	
Obesidad (n=95)	No	42/82 (51,2)	p=0,39
	Si	5/13 (38,5)	
Factores de riesgo (n=92)	No	10/21 (47,6)	p=0,89
	Si	35/71 (49,3)	
Triglicéridos (n=30)	Alto	2/3 (66,7)	p=0,9
	Bajo	17/27 (63,0)	
Estadio (n=98)	I	19/37 (51,4)	p=0,68
	II	5/14 (35,7)	
	III	10/20 (50,0)	
	IV	15/27 (55,6)	
Grado Fuhrman (n=94)	1	1/3 (33,3)	p=0,77
	2	11/25 (44,0)	
	3	20/43 (46,5)	
	4	13/23 (56,5)	
Tamaño tumoral (n=95)	1	23/45 (51,5)	p=0,57
	2	7/19 (36,8)	
	3	13/25 (52,0)	
	4	4/6 (66,7)	
Metástasis (n=98)	No	35/73 (47,9)	p=0,49
	Si	14/25 (56,0)	

Tabla XXIII: Expresión de FGF21s en función de los parámetros clínico-patológicos estudiados en pacientes con CCRcc. Se listan los valores p obtenidos con un test de  $\chi^2$  empleando el percentilo 50 de los pacientes (219,57 pg/ml) como valor de corte para dicotomizar los datos de concentración. Cuando la suma para cada categoría no corresponde al total de los pacientes estudiados se debe a que el dato no pudo encontrarse en la revisión de la historia clínica.

La Figura 35 muestra que, en la población estudiada, los niveles de FGF21s aumentan desde los estadios bajos de la enfermedad, no hallándose diferencias significativas entre los estadios (Test de KW;  $p=0,44$ ) (Tabla XXIV).

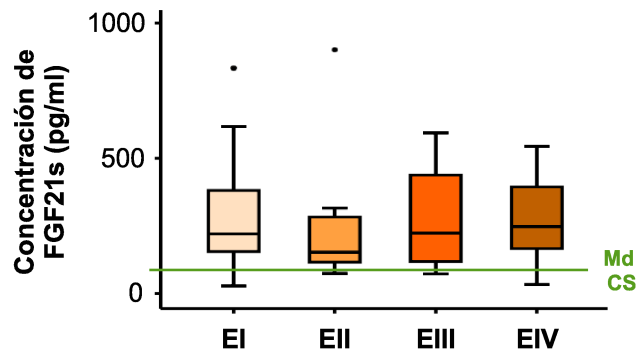


Figura 35: Valores de FGF21s en los distintos estadios. Los círculos representan *outliers*. En verde se indica el valor de la mediana (Md = 76,86 pg/ml) de FGF21s en la población sana.

Estadio CCRcc	n	FGF21s (pg/ml)	
		Mediana	Rango
I	37	220,50	28,54-1635,74
II	14	152,56	74,25-901,31
III	20	223,57	72,94-593,95
IV	27	247,14	33,77-2224,88

Tabla XXIV: Mediana y rango de FGF21s en pacientes con CCRcc divididos de acuerdo al estadio.

En relación a la supervivencia, en esta cohorte de pacientes, el índice de supervivencia a 5 años fue del 100% para los pacientes EI y 41,6% para los EIV con lo que se puede confirmar la representatividad de la población analizada.

Luego, se evaluó si los valores de FGF21s dicotomizados podían predecir la SVG mediante curvas de Kaplan Meier y Test de Log-Rank. Como se observa en la Figura 36 A, no se obtuvo asociación entre los niveles de FGF21s y la SVG (Test de Log Rank). Sin embargo, cuando se analizó la SLE, se obtuvo una significancia borderline (Test de Log-Rank;  $p=0,07$ ) (Figura 36 B).

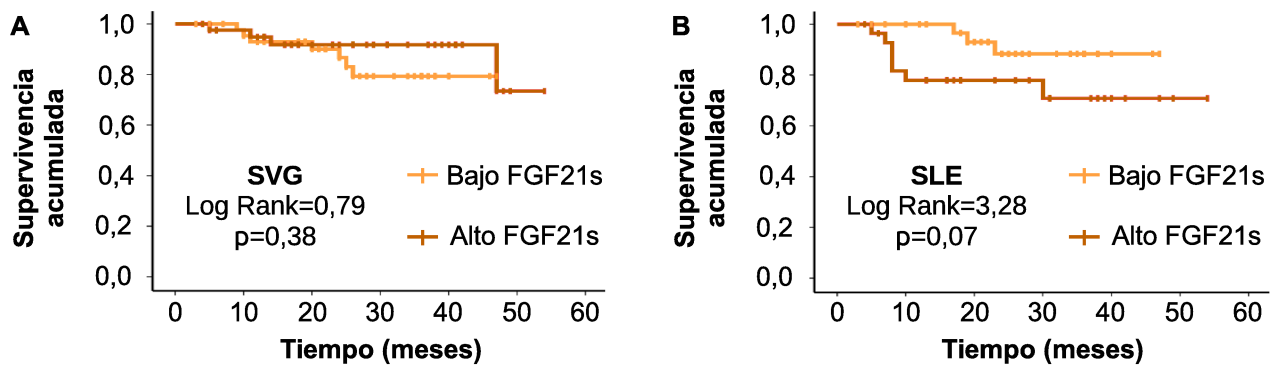


Figura 36: Curvas de Kaplan Meier para (A) SVG y (B) SLE en función de FGF21s en pacientes con CCRcc.

Esta significancia borderline indujo a realizar otros estudios estadísticos. Mediante el análisis multivariado de COX se determinó que FGF21s es un marcador pronóstico independiente cuando se incluyen en el análisis las dos variable más importantes en el pronóstico del paciente con CCRcc: grado nuclear (G) y E (Test de Regresión de COX  $p < 0,05$ ). Los pacientes con FGF21s alto tienen un riesgo relativo 4 veces mayor de recaer (Tabla XXV)

Variable	Estadístico de WALD	Significancia	Ratio de riesgo de recaída (IC95%)
FGF21s ("alto", "bajo")	4,01	0,045	4,17 (1,03-16,85)
Grado Fhurman (1,2,3,4)	2,50	0,11	2,19 (0,83-5,78)
Estadio (I, II, III, IV)	1,89	0,17	1,71 (0,80-3,66)

Tabla XXV: Regresión de COX para SLE en función de FGF21s. IC: Intervalo de confianza.

Por último, se estudió la SLE mediante otro test multivariado. Se desarrolló un árbol de decisión en el que se incluyó como variables factores pronóstico conocidos (E, edad, género, factores de riesgo y G) y FGF21s. El árbol de decisión es una forma gráfica y analítica de representar todos los eventos (en este caso la recaída/recurrencia) en función de los otros factores que pueden tener peso en los eventos, desde el punto de vista probabilístico.

En la Tabla XXVI se puede observar que, en el primer nodo de decisión, respecto de la SLE, se ubica el estadio. En el segundo nodo de decisión para los pacientes de estadio  $\geq$  II se ubicó la concentración de FGF21s. En otras palabras, para los pacientes ubicados en la rama



estadios II y III, aquellos que tienen valores altos de FGF21s tienen mayor riesgo de padecer una recaída/recurrencia.

Variable	SLE							
1 <sup>er</sup> nodo	Estadio = I				Estadio ≥ II			
2 <sup>do</sup> nodo	Factor de riesgo No		Factor de riesgo Si		FGF21s “Bajo”		FGF21s “Alto”	
3 <sup>er</sup> nodo	Género M	Género F	Edad <60	Edad ≥60	Edad <60	Edad ≥60	Género M	Género F

Tabla XXVI: Árbol de clasificación para la SLE en función de FGF21s.

En un subgrupo de pacientes se determinó la expresión de FGF21s en una muestra extraída entre 3 y 9 meses posteriores a la cirugía (M2). La medición de la M2 se realizó en la misma placa de su correspondiente M1. Para el análisis estadístico se estableció que se consideraría relevante una variación del 20% en el valor de FGF21s entre la M1 y la M2. Sólo en el 41% de los pacientes, los niveles de FGF21s disminuyeron luego de la cirugía y, en el mismo porcentaje de pacientes, los valores incrementaron. En un 17% los valores se mantuvieron iguales. La Figura 37 muestra el comportamiento de FGF21s en 9 pacientes EI entre la primera extracción al diagnóstico de la enfermedad y la segunda luego de la cirugía.

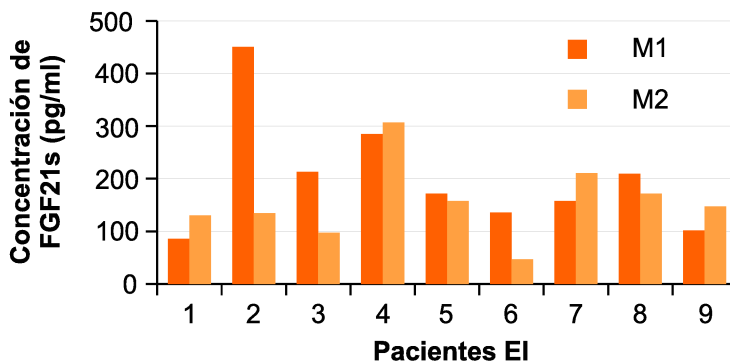
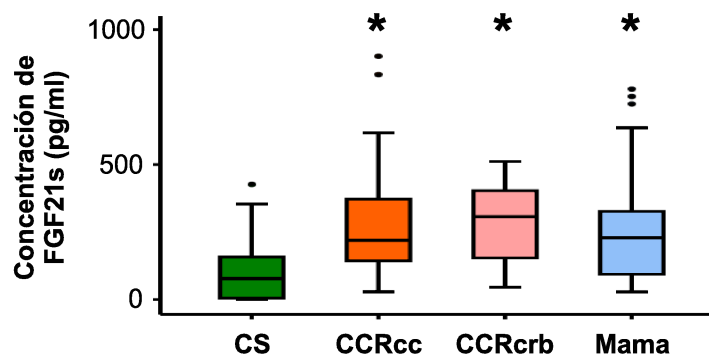


Figura 37: Valores de FGF21s en pacientes EI, antes (M1) y después de la cirugía (M2).

Por último, para evaluar la eficacia de FGF21s como biomarcador diagnóstico de CCRcc, se estudió su concentración en el suero de 14 pacientes con CCRcrb y en 45 pacientes con cáncer de mama al diagnóstico. En la Figura 38 se observa que los niveles de FGF21s se encuentran

aumentados en todos los tipos tumorales con respecto a los CS (Test de KW;  $p < 0,0001$  para todos los tipos tumorales) pero que no hay diferencias en los niveles entre sí (Test de MW).



**Figura 38:** Valores de FGF21s en la población sana y en pacientes con CCRcc o CCRcrb o cáncer de mama. Los círculos negros representan valores *outliers*. \*Test de MW,  $p < 0,0001$  con respecto al CS.

Se puede concluir que FGF21s sería un biomarcador diagnóstico para diversos tipos tumorales de manera inespecífica del origen o tipo histológico.

Al observar que los niveles de FGF21s son significativamente más altos en el suero de pacientes con cáncer de mama, se decidió evaluar si existía alguna asociación con los parámetros clínico-patológicos de estas pacientes. Al igual que para los pacientes con CCRcc, los niveles de FGF21s en pacientes con cáncer de mama no presentan diferencias significativas entre los estadios (Test de KW) o los dos tipos histológicos más frecuentes, ductal y lobulillar (Test de MW) (Figura 39) (Tabla XXVII).

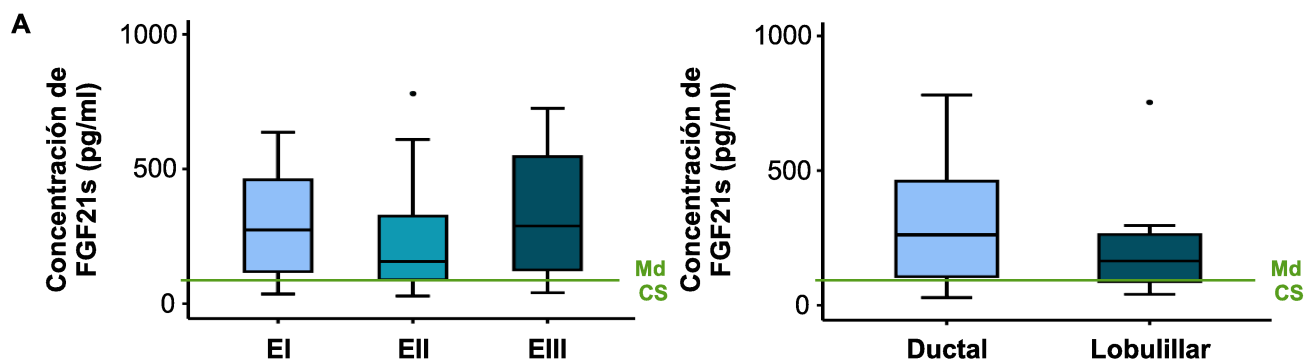


Figura 39: Valores de FGF21s según (A) estadios y (B) tipos histológicos en pacientes con cáncer de mama. Los círculos representan valores *outliers*. La línea verde indica la mediana (Md = 76,86 pg/ml) de la población sana.

Estadio Cáncer de mama	n	FGF21s (pg/ml)	
		Mediana	Rango
I	18	273,41	36,12-636,22
II	16	156,69	28,41-780,45
III	4	288,27	40,53-725,40

Tabla XXVII: Mediana y rango de FGF21s en pacientes con cáncer de mama divididos de acuerdo al estadio. No se incluyen los EIV porque son sólo 2 valores.

En las pacientes con cáncer de mama, tampoco se encontraron correlaciones entre los niveles de FGF21s y el perfil lipídico, la glucemia o la concentración de Leptina (Test de Rangos de Spearman) (Figuras 40 y 41) (Tabla XXVIII).

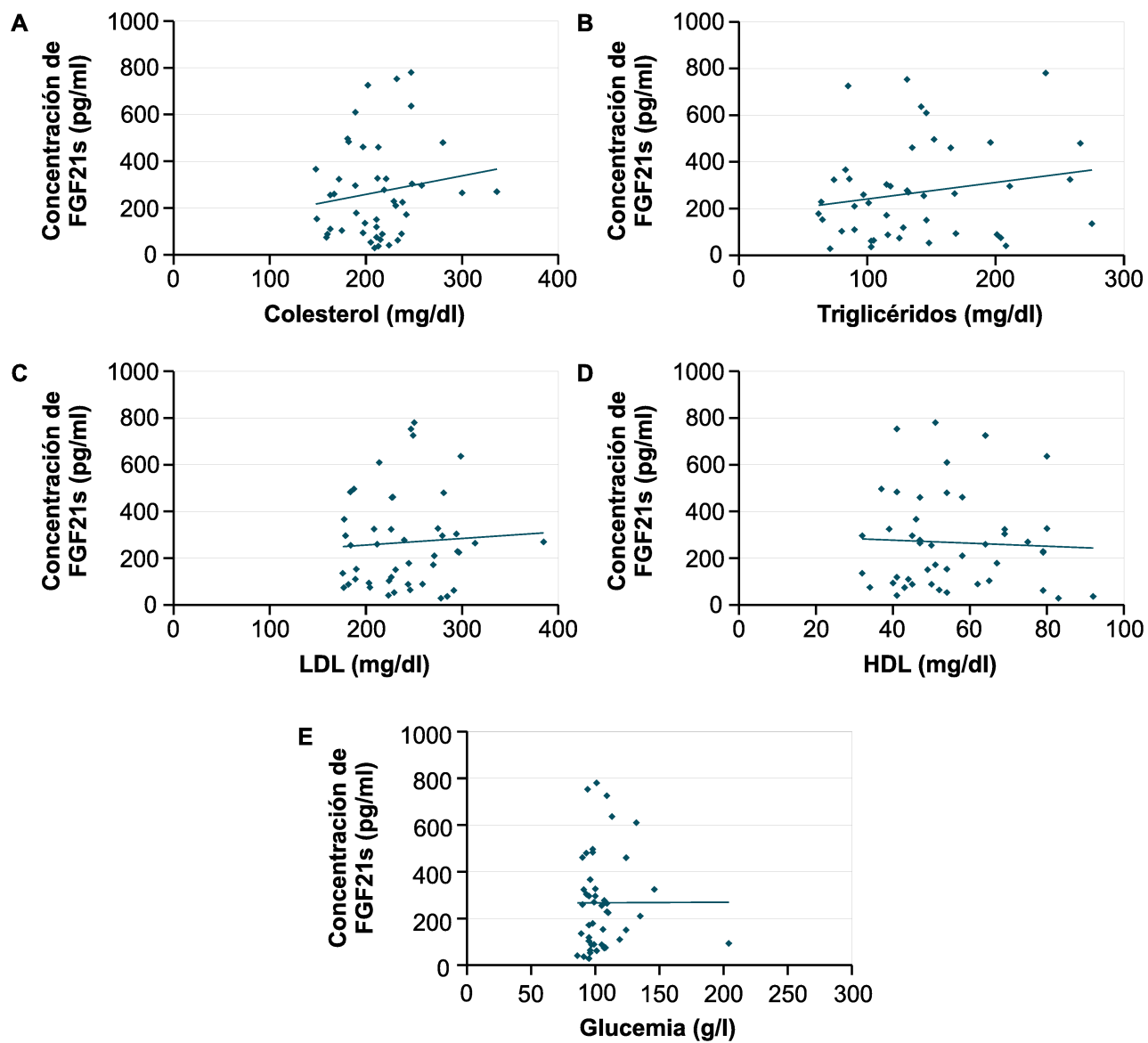
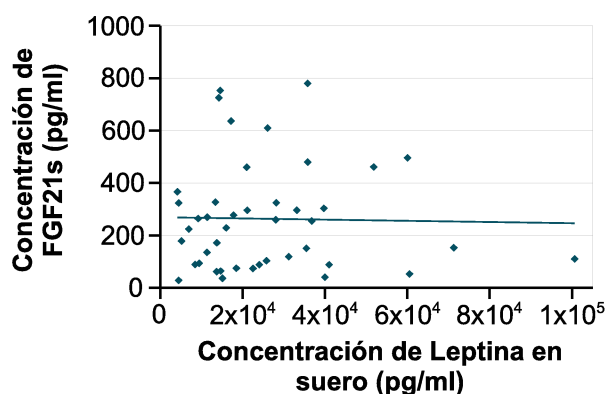


Figura 40: Concentración de FGF21s en función de los valores de (A) colesterol, (B) triglicéridos, (C) LDL, (D) HDL y (E) glucemia medidos en pacientes con cáncer de mama.



**Figura 41: Concentración de FGF21s en función de la concentración de Leptina en pacientes con cáncer de mama.**

Variable	Concentración de FGF21s	
	Test de Spearman	Valor p
Colesterol	0,137	0,34
Triglicéridos	0,168	0,24
LDL	0,101	0,48
HDL	0,024	0,87
Glucemia	0,121	0,40
Leptina	0,042	0,79

**Tabla XXVIII: Correlación entre los niveles de FGF21s y el perfil lipídico, la glucemia y la concentración de Leptina en el suero de los pacientes con cáncer de mama. Se muestra coeficiente del test y el valor p.**

Al igual que en CCRcc, se decidió evaluar el valor de FGF21s como biomarcador diagnóstico en pacientes con cáncer de mama. En la Tabla XXIX se observan, los valores de Especificidad, Sensibilidad, VPP y VPN para FGF21s utilizando el mismo valor de corte que para CCRcc, el percentilo 65 de los CS (130,64 pg/ml). Teniendo en cuenta este valor de corte, se observó que 30 de 45 (66,67%) pacientes presentaban valores altos de FGF21s.

Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
66,67%	64,71%	62,50%	68,75%

**Tabla XXIX: Valores de Especificidad, Sensibilidad, VPP y VPN para FGF21s como biomarcador diagnóstico en cáncer de mama.**

Además, los valores de FGF21s se dicotomizaron en “alto” o “bajo” utilizando como valor de corte el percentilo 50 (228,81 pg/ml) de la población con cáncer de mama y se analizó su asociación con parámetros clínico-patológicos evaluados en cáncer de mama como edad, estadio, grado nuclear e histológico, tamaño tumoral, tipo histológico, expresión de los receptores hormonales [estrógeno (RE) y progesterona (RP)] y HER2. No se hallaron diferencias significativas en ninguno de los casos (Test de  $\chi^2$ ) (Tabla XXX).

Parámetro		FGF21s Alto/Total (%)	Test de $\chi^2$ , valor p
Edad (n=45)	<60	9/23 (39,1)	p=0,18
	≥60	13/22 (59,1)	
Estadio (n=40)	I	11/18 (61,1)	p=0,79
	II	7/16 (43,8)	
	III	3/6 (50,0)	
	IV	1/2 (50,0)	
Grado nuclear (n=43)	1	2/6 (33,3)	p=0,13
	2	11/16 (68,8)	
	3	8/21 (38,1)	
Grado histológico (n=38)	1	2/3 (66,7)	p=0,65
	2	11/18 (61,1)	
	3	8/17 (47,1)	
Tamaño tumoral (n=42)	0	1/2 (50,0)	p=0,57
	I	7/17 (41,2)	
	II	12/21 (57,1)	
	III	0/1 (0,0)	
Tipo histológico (n=40)	IV	1/1 (100,0)	p=0,11
	Ductal	18/32 (56,2)	
RE (n=45)	Lobulillar	2/8 (25,0)	p=0,95
	-	3/6 (50,0)	
RP (n=45)	+	19/39 (48,7)	p=0,52
	-	4/10 (40,0)	
HER2 (n=45)	+	18/35 (51,4)	p=0,24
	-	20/38 (52,6)	
Triple - (n=45)	+	2/7 (28,6)	p=0,14
	No	20/43 (46,5)	
	Si	2/2 (100,0)	

Tabla XXX: Expresión de FGF21s en función de los parámetros clínico-patológicos estudiados en pacientes con cáncer de mama. Se listan los valores p obtenidos con un test de  $\chi^2$  empleando el percentilo 50 de los pacientes (228,81 pg/ml) como valor de corte para dicotomizar los datos de concentración. Cuando la suma para cada categoría no corresponde al total de los pacientes estudiados se debe a que el dato no pudo encontrarse en la revisión de la historia clínica.

Por último, se estudió la SVG y SLE de las pacientes con cáncer de mama en función de los niveles de FGF21s. Al igual que para los pacientes con CCRcc, FGF21s no se asoció con la SVG pero se obtuvo una significancia con la SLE (Figura 42).

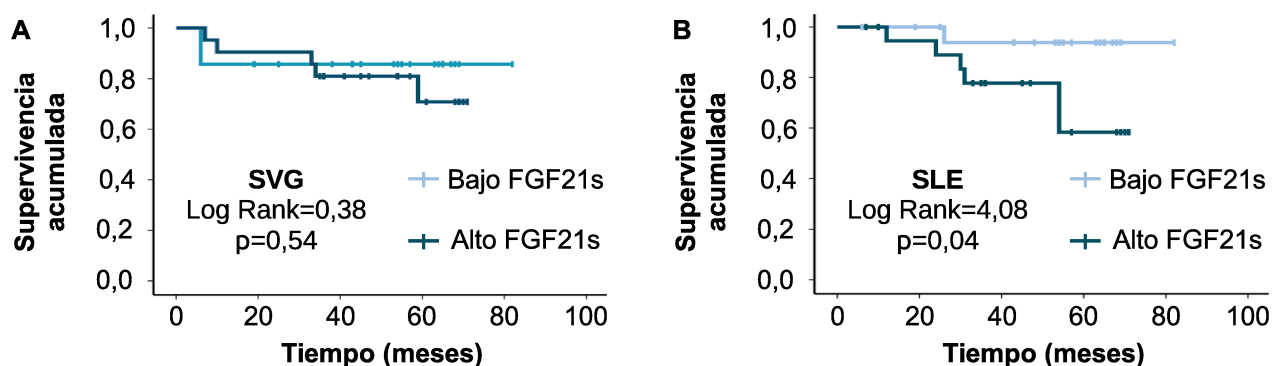


Figura 42: Curvas de Kaplan Meier para (A) SVG y (B) SLE en función de FGF21s en pacientes con cáncer de mama.

Sin embargo, al realizar un estudio multivariado, se observó que FGF21s no es independiente del estadio, el grado nuclear o el tipo histológico para evaluar el pronóstico en términos de SLE (Test e regresión de COX).

### Correlación entre CAIXs y FGF21s

Por último, no se encontró correlación significativa entre los niveles de expresión de FGF21s y CAIXs en la población estudiada (Test de Rangos de Spearman).

## **CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN PARCIAL**

Como sólo unos pocos estudios han analizado los niveles de FGF21 circulante se realizó una exploración inicial de su expresión en una cohorte de 51 voluntarios sanos. La mediana de la concentración de FGF21s fue de 79,9 pg/ml con un rango de 0-425,6 pg/ml, similares a los obtenidos por Gälman et al. en una población sueca sana (mediana 156 pg/ml, rango 23-5300 pg/ml) (227).

Al igual que los resultados obtenidos en otros trabajos, FGF21s en los CS no se asoció con la edad o el género, ni correlacionó con los niveles de LDL, HDL, colesterol y glucemia (227,228). Sin embargo, FGF21s correlacionó de manera directa con los niveles de triglicéridos. En este sentido, Zhang *et al.* encontraron que FGF21 en suero correlaciona de manera directa con los valores de triglicéridos pero inversamente con los niveles de HDL y colesterol luego de hacer un ajuste por edad e índice de masa corporal en una población en la que se incluyó individuos delgados y obesos (229). Es más, como Leptina y FGF21 son moléculas involucradas en la regulación metabólica, en este trabajo se analizó si existía correlación entre estas adipocinas circulantes, sin embargo no se encontró ninguna asociación.

De manera similar a la población control, FGF21s no se asoció con la edad ni el género ni correlacionó con los niveles de Leptina, glucemia, LDL, HDL o colesterol total en la población de pacientes con CCRcc. A pesar de que los niveles de triglicéridos fueron similares entre pacientes y CS, la cohorte de pacientes con CCRcc no mostró correlación entre FGF21s y la concentración de triglicéridos. Además, en los pacientes con CCRcc, FGF21s no correlacionó con el peso o el índice de masa corporal.

Este estudio determinó que los niveles de FGF21s están aumentados en pacientes con CCRcc comparado con los CS. El aumento se detectó desde los primeros estadios de la enfermedad, ya que los EI poseen valores significativamente mayores de FGF21 con respecto a los CS. Estos resultados refuerzan su potencial uso como biomarcador diagnóstico en esta patología oncológica.

En la población de pacientes con CCRcc, FGF21s mostró una elevada sensibilidad para el diagnóstico de la enfermedad (~80%) aunque con una mediana especificidad (~65%). Sin embargo, según lo que ha sido reportado por otros autores, FGF21s podría estar aumentada en otras condiciones clínicas como ayuno u obesidad o por diversas patologías como el daño hepático, cirrosis, síndrome metabólico, diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad coronaria, entre otras (167,175,177,178,229–231). Además, el tejido muscular en condiciones de estrés producido por perturbaciones en el metabolismo energético mitocondrial, responde aumentando la secreción de



FGF21 a la circulación (230). Toda esta evidencia debiera ser tomada en cuenta al proponer a FGF21s como un biomarcador diagnóstico para CCRcc.

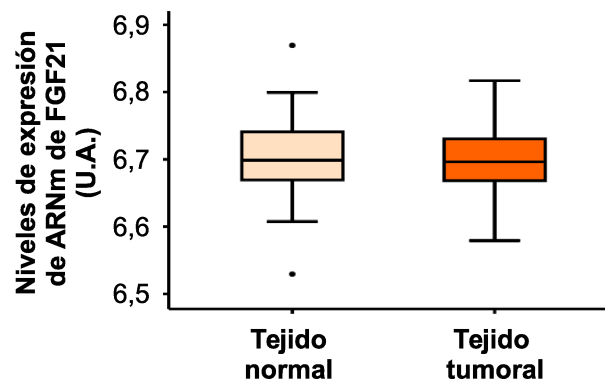
En este estudio, se demostró que FGF21s también estaba incrementado en pacientes con CCR cromóforo, otro tipo histológico de CCR, y en pacientes con cáncer de mama, indicando que su incremento no se restringe sólo a los pacientes con CCRcc. Es más, Yang *et al.* también encontraron que FGF21 está aumentado en pacientes con cáncer de hígado (175). En base a estos resultados se puede concluir que FGF21s podría ser un marcador universal de cáncer en vez de un biomarcador específico de CCRcc y debiera ser utilizado en combinación con otros biomarcadores.

Por otro lado, los niveles elevados de FGF21s en pacientes con CCRcc podrían deberse a una disfunción renal causada por la presencia del tumor que impida su correcto *clearance*. En este sentido, Stein *et al.* describieron un aumento de FGF21s en pacientes con otras patologías renales que realizan diálisis crónica (231). Para analizar esta hipótesis, se estudió la función renal en nuestra población de pacientes calculando el *clearance* de creatinina utilizando la fórmula de Cockcroft-Gault. Como no se encontró asociación entre estos valores y FGF21s es posible descartar la idea de que los niveles elevados de FGF21s en CCRcc estén asociados a una disfunción renal.

Los niveles elevados de FGF21s podrían deberse a un aumento en la síntesis de FGF21 en las células tumorales o podría deberse a una respuesta fisiológica generalizada que se desarrolla en respuesta a la enfermedad tumoral. En relación a esta última hipótesis, es posible que la sola presencia del tumor induzca una condición de estrés produciendo defectos en la homeostasia metabólica llevando a un aumento de FGF21s. Reforzando esta hipótesis, el análisis de los niveles de FGF21s luego de la cirugía para la extirpación del tumor primario, reveló que los niveles de FGF21s disminuyen sólo en el 40% de los pacientes con CCRcc durante el seguimiento temprano. Sin embargo, es imposible asegurar la ausencia de enfermedad subclínica que justifique los niveles de FGF21s posteriores a la cirugía.

Para reforzar aún más la hipótesis de que el aumento en los niveles de FGF21 se deben a una respuesta fisiológica y no a una sobreexpresión en las células tumorales, se evaluaron sus niveles de transcripción, en tejido normal y tumoral, en una base de datos de microarray de CCRcc. Se encontró que los niveles de ARNm de FGF21 en células tumorales no difieren significativamente respecto de células no tumorales (Test t para el análisis de medias) (213). Este estudio se llevó a cabo en 101 pacientes con CCRcc en República Checa y se utilizó un microarray basado en la tecnología Illumina®. Para la detección del ARNm de FGF21 se utilizaron dos sondas lo que permite disminuir el error. La Figura 43 muestra el *boxplot* que surgió de nuestro análisis, el cual se obtuvo promediando los resultados correspondientes a las dos sondas de FGF21. Los datos

poseen distribución normal (Test de Kolmogorov-Smirnov, NS). Sin embargo, el estudio de microarray podría no reflejar los niveles de proteína y no es posible descartar que exista una regulación postranscripcional.



**Figura 43:** Niveles de expresión del ARNm de FGF21 en tejido normal y en tejido tumoral de pacientes con CCRcc (los círculos representan valores *outliers*).

A la fecha, no se han reportado resultados previos que indiquen el papel de FGF21s como un biomarcador pronóstico. Los resultados obtenidos en la cohorte de pacientes estudiada indicaron que FGF21s es un biomarcador pronóstico de relevancia. En este sentido, los pacientes con altos niveles de FGF21s al diagnóstico presentaron una menor SLE. El análisis estadístico univariado, de Kaplan Meier, arrojó un resultado con significancia estadística *borderline* ( $p=0,07$ ). Esto motivó a realizar un análisis más profundo utilizando el método multivariado de COX que indicó que FGF21s es un biomarcador de SLE independiente del estadio y del grado nuclear de Fuhrman, dos marcadores de pronóstico utilizados hoy en día en la clínica en el seguimiento de los pacientes con CCRcc. También, mediante el desarrollo de un árbol de decisión, otro método multivariado, FGF21s diferenció la supervivencia libre de enfermedad para pacientes con estadios II y III en el nodo II (por debajo del estadio en el nodo I).

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo, en pacientes con CCRcc, parecieran indicar que los niveles elevados de FGF21s están asociados con peor pronóstico en términos de recaída dentro de un período de 5 años.

En el presente trabajo también se analizó el valor de FGF21s como biomarcador en cáncer de mama. Entre los biomarcadores tisulares utilizados para este tipo de patología oncológica se encuentran los receptores hormonales de estrógeno y progesterona y, el receptor de tirosina-quinasa HER2. Estos receptores dan información predictiva y pronóstica de las pacientes y se

evalúan a nivel tisular. Menos utilizados son los marcadores séricos, siendo el CA 15-3 uno de los más conocidos, que es evaluado fundamentalmente para el monitoreo de las pacientes (232). No existen biomarcadores séricos de gran utilidad clínica en cáncer de mama, a pesar de la gran ventaja que presenta el suero como fuente de información ya que permite un seguimiento poco invasivo durante el transcurso de la enfermedad.

En este trabajo se determinó, como se mencionó anteriormente, que los niveles de FGF21s fueron significativamente mayores en pacientes con cáncer de mama con respecto a los CS pero no con respecto a los pacientes con CCRcc o CCRcrb. FGF21s mostró una mediana sensibilidad y especificidad (~65%) para el diagnóstico de cáncer de mama.

En estas pacientes, los niveles de FGF21s presentaron resultados muy similares que los observados en pacientes con CCRcc. No se encontró diferencias significativas entre estadios lo que implica que, también en este tipo tumoral, los niveles de FGF21s aumentan desde los estadios más bajos de la enfermedad. Tampoco se observaron diferencias significativas entre los dos tipos histológicos más comunes de cáncer de mama, ductal y lobulillar.

También se evaluó, en estas pacientes, una posible asociación de FGF21s con los componentes del perfil lipídico, la glucemia o la concentración de Leptina que, al igual que para los pacientes con CCRcc no arrojaron resultados significativos. Al igual que para los pacientes con CCRcc, no se obtuvieron asociaciones significativas entre los niveles de FGF21s dicotomizados según el percentilo 50 de la población con cáncer de mama y los datos clínico-patológicos evaluados.

No se observó asociación significativa con la SVG, pero sí con la SLE. En este caso, a diferencia de los pacientes con CCRcc, donde la asociación que se obtuvo fue *borderline*, la asociación fue de un  $p < 0,05$ . Sin embargo, a diferencia de la población con CCRcc la significancia se pierde al agregar en el análisis multivariado otras variables pronósticas como el estadio, el grado nuclear o el tipo histológico.

No hay información disponible sobre el rol de la heptoquina FGF21 en la progresión tumoral teniendo en cuenta que, al ser estable en circulación, podría actuar como un factor endocrino. Se ha reportado que FGF19, perteneciente a la misma subfamilia de FGF a la que pertenece FGF21, puede actuar como un factor autocrino promoviendo la progresión del cáncer de próstata (233). Es más, se demostró que un anticuerpo monoclonal contra FGF19 que, selectivamente bloquea la interacción de FGF19 con FGFR4, inhibe el crecimiento de implantes xenográficos de tumor de colon in vivo y previene el desarrollo de hepatocarcinomas en ratones transgénicos para FGF19 (234). Sin embargo, no hay información disponible sobre FGF21.

Luo et al. reportaron que la ablación de FGFR4 en ratones con tumores de mama, inducidos por sobreexpresión de TGF $\alpha$ , genera una reducción de la progresión tumoral. Los autores adjudicaron este efecto a los elevados niveles de FGF21, generados por la ausencia de FGFR4, que podrían tener efectos antitumorales y podrían estar siendo secretados tanto desde el tejido adiposo circundante como del tumoral (174). No podemos conocer los niveles de expresión de FGFR4 en la población de pacientes incluidas en este trabajo pero, en base a los resultados obtenidos, hipotetizamos que los niveles elevados de FGF21s se deben a una respuesta fisiológica general como respuesta al estrés generado por la enfermedad tumoral más que a una estrategia antitumoral. Sin embargo, no contamos con información experimental suficiente como para sacar una conclusión al respecto.

FGF21s pareciera ser un marcador inespecífico de la presencia de un tumor con una sensibilidad alta en CCRcc y mediana para cáncer de mama y una especificidad media para ambos tumores. El resultado más importante observado fue la asociación entre los niveles de FGF21s y la SLE tanto en pacientes con CCRcc como en pacientes con cáncer de mama. En CCRcc incluso, la asociación es independiente del estadio y el grado nuclear. Este resultado indica que una elevada concentración de este marcador, al momento del diagnóstico, estaría relacionada con una mayor probabilidad de padecer una recaída durante el seguimiento entre los primeros 5 años para pacientes con CCRcc.

## RESÚMEN PARCIAL DE RESULTADOS

### Biomarcadores tisulares en CCRcc

Biomarcador		Tumores con alta expresión (%)	Asociación con Parámetros clínico-patológicos	Impacto en supervivencia	
				SVG	SLE
GLUT1	Membrana	52	No	No	Solo >70%
	Citoplasma	50	No	No	No
CAIX	Membrana	54	M	No	No
	Citoplasma	29	Fac. de Riesgo	No	No

Tabla XXXI: Resumen de resultados obtenidos en el análisis de marcadores en el tejido tumoral.

### Biomarcadores séricos

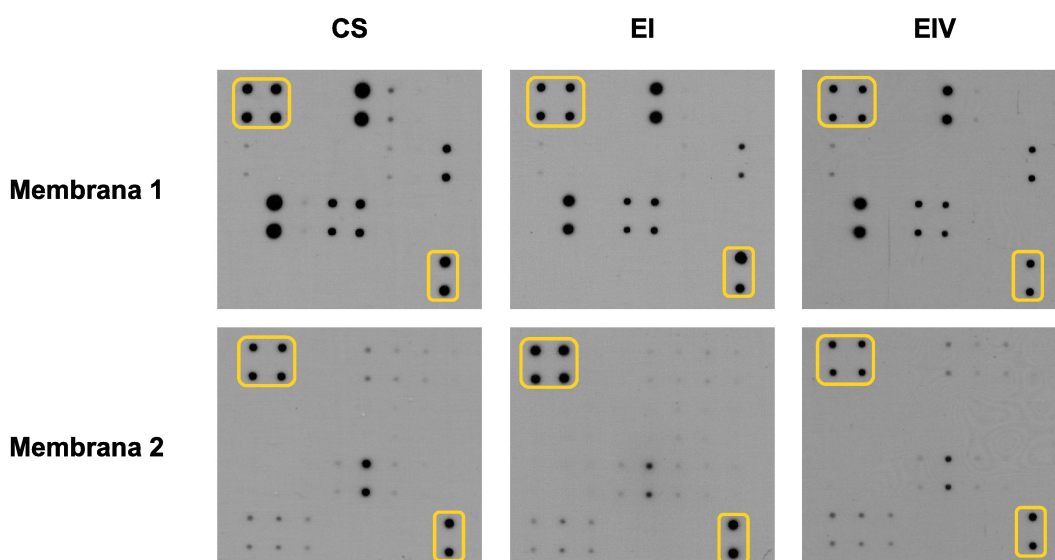
Biomarcador	Significancia vs CS	Se (%)	Es (%)	Asociación con parámetros clínico-patológicos	Impacto en supervivencia	
					SVG	SLE
CAIXs	Si	75	76	T, M y E	Si	No
FGF21s	Si	81	65	No	No	Si

Tabla XXXII: Resumen de resultados obtenidos en el análisis de marcadores en suero.

## **EXPRESIÓN DE 43 PROTEÍNAS ASOCIADAS AL PROCESO ANGIOGENICO EN PACIENTES PORTADORES DE CCRcc**

Sabiendo que el CCRcc posee alteradas las vías angiogénicas, se decidió estudiar, mediante la técnica de microarray de proteínas, la expresión de 43 moléculas relacionadas con el proceso angiogénico en 26 pacientes con CCRcc y 14 CS. Esta técnica permite determinar los niveles de expresión de múltiples moléculas en una muestra. Para esto se utilizaron las membranas de RayBio® que provee de 2 membranas para analizar 43 proteínas

En la Figura 44 se observa una imagen representativa de los resultados obtenidos para una muestra de cada población estudiada, CS, EI y EIV.



**Figura 44: Resultados de microarray de proteínas representativo para sueros provenientes de un CS, un paciente con CCRcc EI y un paciente con CCRcc EIV. Para el estudio de las 43 moléculas se emplean 2 membranas por paciente. En amarillo se destacan las posiciones de los controles positivos de las membranas.**

Se cuantificaron los valores de expresión y se realizó un Análisis por Componentes Principales (PCA) como método multivariado teniendo en cuenta a la población completa o cada población (CS, EI y EIV) por separado. En la Figura 45 se muestran los *biplot* de las componentes 1 y 2 obtenidos.



componentes se explica el 79%. Estos resultados indican que es posible reducir considerablemente el número de variables en cada población estudiada.

Si se analiza el aporte de cada variable, se encontró que sólo 2 variables no contribuyen en las componentes de ningún análisis: ni en el análisis de todas las poblaciones juntas, ni en el de las poblaciones por separado. Estas variables son bFGF y TIMP-1. Cuando se evaluaron aquellas que explican, al menos, una componente en cada análisis se encontraron 14 variables. Estas variables son IL-6, PIGF, VEGF, VEGFD, Angiopoietina-1, I-309, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, MCP-3, MCP-4, MMP-1, PECAM-1.

Como las variables no poseen distribución normal (Test de Shapiro-Wilks;  $p < 0,05$ ), se utilizó un contraste no paramétrico para evaluar si existen diferencias significativas entre los CS, EI y EIV de cada una de las 14 variables que contribuyeron en todos los análisis por PCA. Se observó que Angiopoietina-1, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MMP-1 y PECAM-1 difieren significativamente en las 3 poblaciones (Test de KW;  $p = 0,004$ ;  $p = 0,009$ ;  $p = 0,021$ ;  $p = 0,020$ ;  $p = 0,006$  respectivamente). Se realizaron, entonces, tests de Mann Whitney entre cada población. La Figura 46 muestra los resultados obtenidos.



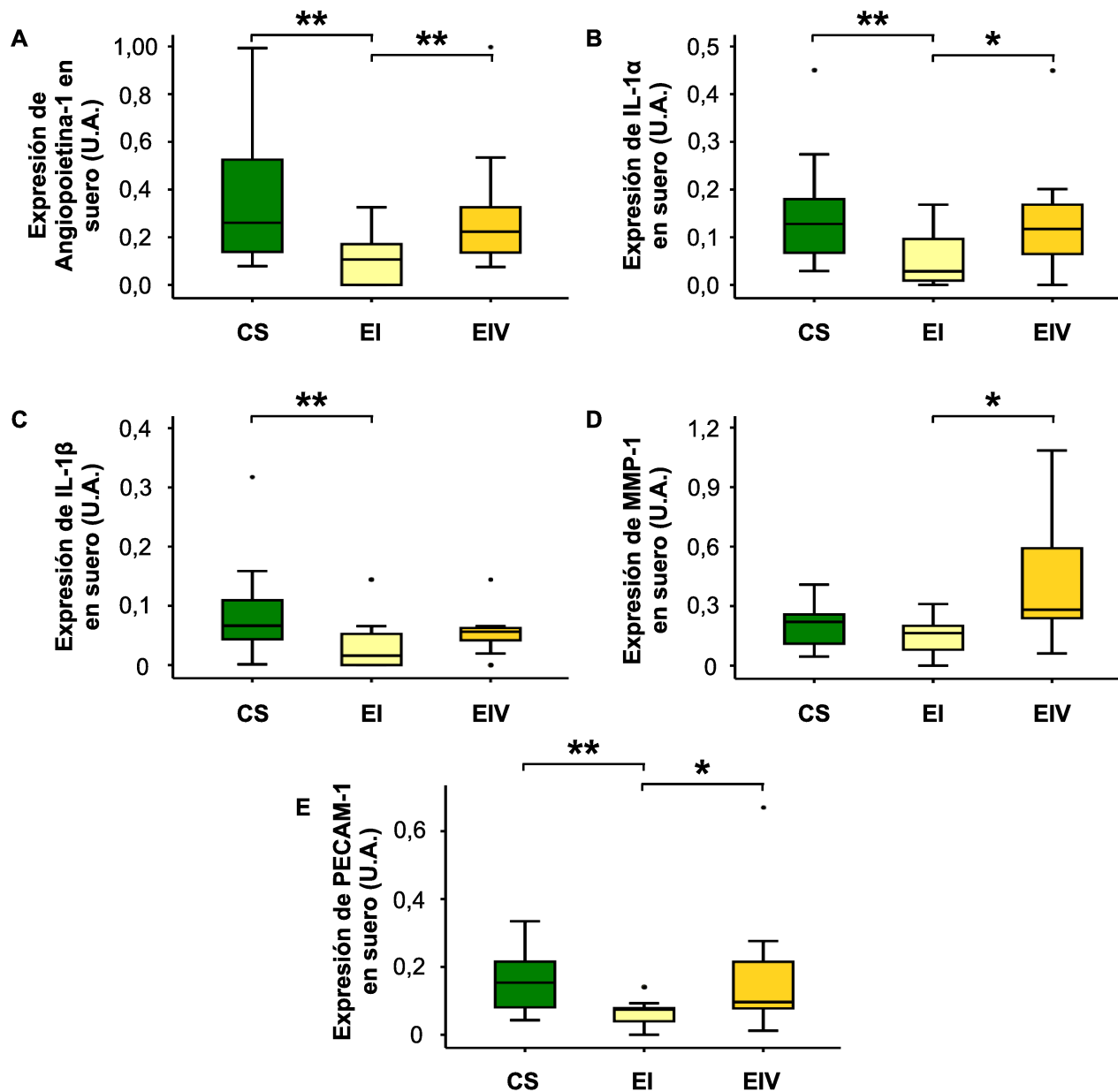


Figura 46: Niveles de expresión, en las distintas poblaciones, de las variables identificadas por PCA. (Los círculos negros representan valores *otliers*). \*\* Test de MW,  $p < 0,01$ ; \*Test de MW;  $p < 0,05$ .

Para realizar un análisis más profundo sería necesario contar con un número mayor de muestras ya que se incluyen 43 variables y sólo 40 muestras. Sin embargo, como los costos de la técnica son elevados, se decidió no continuar con este estudio.

## **CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN PARCIAL**

Mediante la técnica de microarray de proteínas se estudió un panel de 43 proteínas involucradas en el proceso angiogénico en 14 CS, 13 EI y 13 EIV. Realizando un análisis multivariado de PCA se pudo reducir la dimensión de análisis a 9 componentes para la población completa, a 6 para los CS y a 5 para los EI y EIV. Se encontraron 14 moléculas que explican la variabilidad en todos los análisis y sólo 5 de ellas difieren significativamente para comparar las 3 poblaciones. Éstas son: Angiopoietina-1, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MMP-1 y PECAM-1. La tendencia que se observa, en general en todas las moléculas, es a que la concentración disminuye significativamente en los EI con respecto a los CS, pero que vuelven a los valores control en los pacientes EIV.

**Angiopoietina-1 (Ang-1):** es una glicoproteína de secreción que actúa a nivel de la microvasculatura para controlar el desarrollo de vasos sanguíneos y su estabilización (235). Es sintetizada y secretada, principalmente, por las células perivasculares como pericitos, células de músculo liso de los vasos y células tumorales (236,237). En la membrana plasmática de las células endoteliales Ang-1 se une a su receptor tirosina quinasa, Tie-2, y dispara la transducción de señales que promueven la supervivencia de las células endoteliales, el mantenimiento de la barrera endotelial y la quiescencia de la vasculatura (238,239). Se ha demostrado que en condiciones de hipoxia, VEGF-A y PDGF elevan los niveles de expresión de Ang-1 en pericitos y en células de músculo liso de los vasos sanguíneos (240,241). Estas evidencias sugerirían un aumento de Ang-1 asociado a una mayor angiogénesis, característica de los tumores CCRcc. Sin embargo, en nuestra población se observó una disminución significativa en los EI con respecto a los CS pero niveles similares entre los EIV y los CS.

**IL-1 $\alpha$ /IL-1 $\beta$ :** Ambas son citoquinas citoplasmáticas. Se sintetizan como polipéptidos precursores que no poseen péptido señal y pueden ser procesadas para dar una proteína madura más corta que constituye el extremo COOH del precursor (242). El precursor de IL-1 $\alpha$  se encuentra expresado constitutivamente en células no hematopoyéticas como en las células epiteliales del tracto intestinal, el hígado, riñón y en queratinocitos (243–245). También los fibroblastos pueden expresar IL-1 $\alpha$  en condiciones de estrés o inflamación (246). El precursor de ambas IL-1 puede ser clivado por diversas proteasas activando la secreción de la forma activa de las IL-1 que actúa como una citoquina proinflamatoria. También las IL-1 $\alpha$  puede glicosilarse y dirigirse a la membrana plasmática de monocitos y macrófagos activados, e incluso de otras células, y ejercer su acción de activación de células blanco como células T o endoteliales (247–250).

El efecto que cada citoquina produce sobre en células tumorales depende de su compartimentalización. Si las citoquinas IL-1 son secretadas, pueden producir inflamación y progresión tumoral. Si, por ejemplo IL-1 $\alpha$ , se localiza en membrana plasmática induce inmunidad

antitumoral, asociado a un crecimiento tumoral limitado (251–255). Se reportó que ambas citoquinas secretadas pueden promover invasión tumoral, metástasis y carcinogénesis química debido a la respuesta inflamatoria que producen (256,257).

En la población estudiada, ambas citoquinas presentaron significativamente menor expresión en los pacientes EI con respecto a los CS. Para la citoquina IL-1 $\beta$  incluso pareciera haber una tendencia a que los niveles permanezcan disminuidos en la población de EIV. Si sólo se analizaran las poblaciones de EI y EIV, los niveles de IL-1 $\alpha$  aumentan en tumores más avanzados, mientras que los de IL-1 $\beta$  permanecen igual. Sin embargo, es difícil hipotetizar porqué se produce una disminución de las citoquinas inflamatorias en los estadios bajos con respecto a los controles. Hacen falta más estudios que permitan dilucidar estos resultados.

**MMP-1:** Pertenece a la familia de las metaloproteasas, MMPs por las siglas *Matrix Metallo Proteinases*, compuesta de 24 miembros y que colectivamente, son capaces de degradar todos los sustratos de la matriz extracelular incluyendo colágenos, laminina, fibronectina, vitronectina y proteoglicanos (258,259). Todos los miembros de la familia poseen dos dominios conservados, el prodominio y el dominio catalítico, en el que se encuentra unido un ion Zn<sup>2+</sup>. MMP-1 es la colagenasa intersticial más ampliamente expresada y también se la llama “Colagenasa-1” porque degrada colágeno tipo I, pero también degrada colágenos tipo II, III, IV, IX (260,261). MMP-1 está sobreexpresada en una amplia variedad de cánceres avanzados y se ha sugerido que estaría asociada a la invasión tumoral y la metástasis, al igual que las MMP-2 y 9 asociadas más frecuentemente al fenotipo invasivo (262). Incluso, se ha reportado que su expresión se asocia con una menor supervivencia en pacientes con cáncer colorrectal (263). Petrella *et al.* demostraron que la incubación de células de CCRcc 786-O (VHL<sup>-/-</sup>) con IL-1 $\beta$  induce la secreción de MMPs, entre las que se encuentran MMP-1 (264).

En nuestra población se observó un aumento significativo en la concentración de MMP-1 en los EIV con respecto a los EI, incluso a pesar de los niveles disminuidos de IL-1 $\beta$  discutidos en el punto anterior. Probablemente el aumento en MMP-1 se debe a algún mecanismo alternativo de regulación de la secreción de MMP-1. Sin embargo, a pesar de que observa una tendencia, no se obtuvieron diferencias significativas de los niveles de MMP-1 en los EIV con respecto a los CS. Probablemente, un número mayor de muestras permitirá resolver esta tendencia.

**PECAM-1:** De sus siglas en inglés *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*, es un miembro de la superfamilia de moléculas Ig de adhesión celular y una glicoproteína transmembrana tipo I que posee seis dominios homólogos extracelulares tipo Ig (265). PECAM-1 se expresa en células no eritroides del linaje hematopoyético, incluyendo plaquetas, monocitos, neutrófilos y células T y B humanas (265–267). PECAM-1 también se expresa en células endoteliales donde es

el mayor constituyente molecular de la unión intercelular. Más específicamente, PECAM-1, cumple un rol vital en la migración de leucocitos y en la angiogénesis (268–272).

En nuestra población los niveles de PECAM-1 son significativamente menores en los EI con respecto a los CS y mayores en los EIV con respecto a los EI pero no difieren de los CS. Siendo una molécula involucrada en la angiogénesis, sería de esperar que estuviese aumentada en los EIV con respecto a los CS e incluso a los EI.

En líneas generales todas las moléculas estudiadas disminuyen en los EI pero en los EIV vuelven a valores similares a los de los CS. Ninguna de las moléculas estudiadas poseen diferencias significativas entre los controles y los EIV a pesar de que en algunos casos se observa una tendencia a que disminuyan o aumenten. Es difícil encontrar una explicación a este comportamiento en moléculas involucradas en la angiogénesis, la inflamación o la remodelación de matriz extracelular, características asociadas al proceso tumoral.

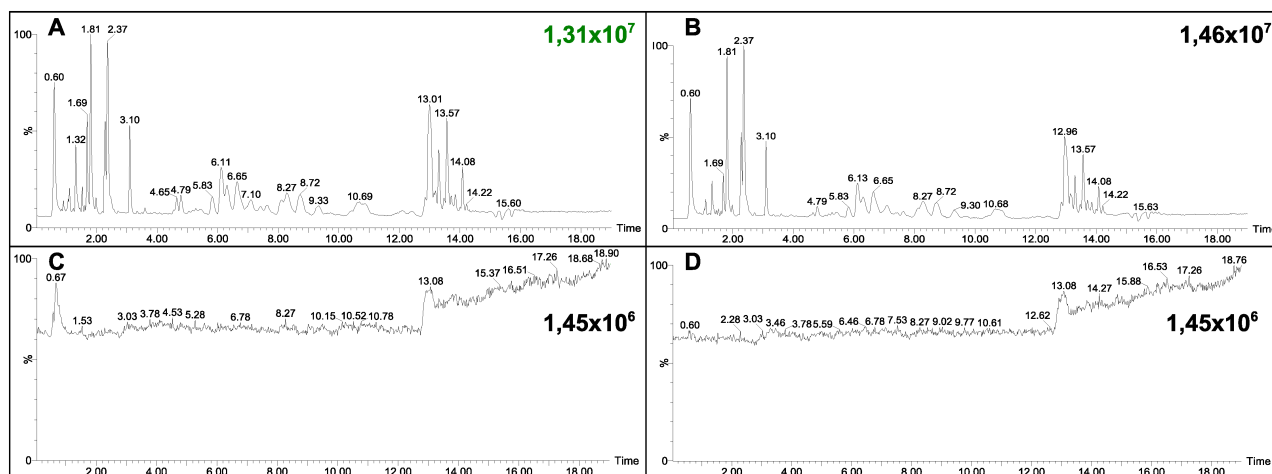
Es obvio que es necesario aumentar el número de pacientes para realizar este tipo de análisis en el que se estudian muchas variables al mismo tiempo. Pero, por otro lado, como las membranas empleadas para realizar la técnica del microarray de proteínas demostró tener un error intra e interexperimento mucho mayor al indicado por el proveedor y los costos de la técnica son elevados se decidió no continuar con el estudio.

## **ESTUDIO METABOLÓMICO PRELIMINAR POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ULTRA PERFORMANCE ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN (UPLC-QTOF-MS)**

Este estudio se desarrolló en el marco de una colaboración con el Centro de Investigaciones en Bionanociencias "Elizabeth Jares Erijman" (CIBION) bajo la dirección de la Dra. María Eugenia Monge.

En una primera etapa, se desarrolló y optimizó un método para extraer los metabolitos del suero y obtener cromatogramas “ricos” en información. Luego de ensayar diferentes solventes para precipitar las proteínas y removerlas de los sueros, se estableció un método reproducible y eficaz utilizando isopropanol. La optimización del método de UPLC-QTOF-MS (Ultra Performance Liquid Chromatography-Quadrupole Time-of-Flight-Mass Spectrometry) se efectuó mediante un *pool* de muestras correspondientes a un paciente enfermo y a un individuo sano. Para la separación cromatográfica se evaluaron distintas mezclas de solventes, como por ejemplo, metanol-agua, acetonitrilo-agua, metanol-ácido acético 0,1% v/v y diferentes mezclas de acetonitrilo, isopropanol, y agua conteniendo acetato de amonio 10 mM y ácido acético 0,1% v/v. También se optimizó el caudal y la temperatura de la columna. Esta etapa de la metodología es crucial para luego obtener la mayor cantidad de especies iónicas características de los compuestos presentes en las muestras. Las condiciones utilizadas que resultaron satisfactorias para la preparación de las muestras, la separación cromatográfica y la ionización de los compuestos en el espectrómetro de masas se describen en Materiales y Métodos.

Una vez establecido el protocolo de extracción de metabolitos y el método analítico de UPLC-MS, y luego de haber verificado la ausencia de contaminación cruzada entre inyecciones consecutivas en el instrumento, se procedió al análisis de 5 muestras séricas de CS y 5 de pacientes con CCRcc EIV para efectuar un estudio preliminar no dirigido de metabolómica (*untargeted metabolomics*). Las muestras se analizaron en modo de ionización por electrospray positivo (ESI<sup>+</sup>) y negativo (ESI<sup>-</sup>). En este capítulo se ejemplifica la metodología empleada con los resultados obtenidos en ESI<sup>-</sup>. La Figura 47 muestra cromatogramas representativos de los componentes del suero de un CS y de un paciente con CCRcc, contrastados con los cromatogramas correspondientes al solvente y el blanco.

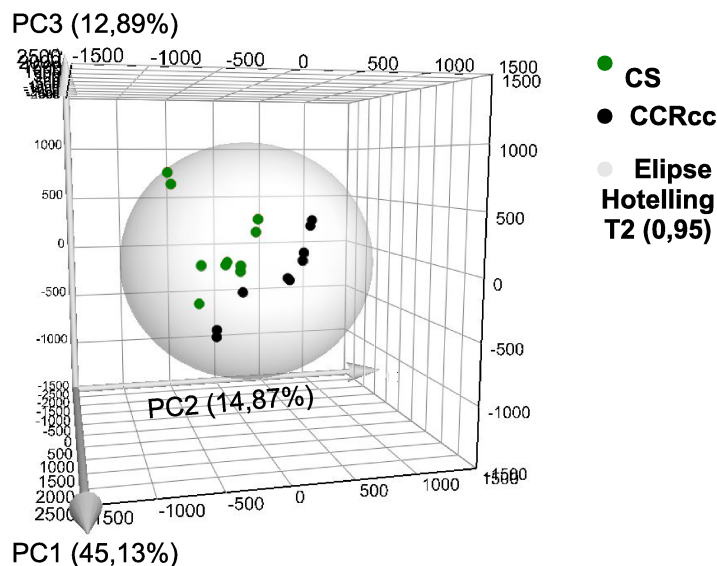


**Figura 47: Cromatogramas de corriente total de iones representativos de sueros provenientes de (A) un control sano, (B) un paciente con CCRcc, (C) el solvente y (D) el blanco, obtenidos en ESI.**

Una vez efectuado el análisis de las muestras por UPLC-MS, se obtuvieron los perfiles metabólicos, que se analizaron y compararon mediante métodos de análisis multivariado. Se utilizó el software Progenesis Q1 para extraer la información de los cromatogramas y de los espectros de masas, dado que para cada punto que conforma el cromatograma existe un espectro de masas asociado. Es decir, se obtuvieron los pares de tiempos de retención y valores de  $m/z$  relacionados (pares  $t_r$ - $m/z$ ) que corresponden a especies iónicas provenientes de los metabolitos presentes en las muestras analizadas. Este proceso involucró el alineamiento de los cromatogramas, la identificación e integración de las señales, la extracción de las áreas de pico, y su normalización. Luego de efectuar este procedimiento, se extrajeron 2.587 variables metabólicas (pares  $t_r$ - $m/z$ ), demostrando la alta eficiencia del método de UPLC-MS desarrollado y optimizado para separar los componentes de muestras de alta complejidad como los sueros.

A partir de la matriz de datos obtenida, se realizó un análisis de componentes principales para las muestras de CS y de pacientes con CCRcc (EIV). La Figura 48 ilustra la distribución espacial de las muestras (analizadas por duplicado) en el nuevo espacio vectorial definido por las tres primeras componentes principales, que acumularon aproximadamente el 73% de la varianza total de los datos (PC1=45,13%, PC2=14,87% y PC3=12,89%). El 99% de la varianza fue acumulado en las primeras 9 componentes principales. Considerando que la matriz inicial de datos contiene 2.587 variables, mediante el análisis de componentes principales se logró una reducción apreciable de la dimensión del problema. Asimismo, a partir de una inspección visual del gráfico se pueden diferenciar dos regiones en el espacio que contienen las muestras correspondientes a cada una de las clases analizadas (CS vs CCRcc). Además, todas las muestras se ubicaron

espacialmente dentro de la elipse de Hotelling para un intervalo de confianza del 95%, evidenciando la ausencia de *outliers*.



**Figura 48: Análisis de Componentes Principales.**

Dado que uno de los objetivos de un estudio metabolómico es encontrar un panel de biomarcadores discriminantes que permita diferenciar las muestras de acuerdo con la presencia o ausencia de la patología estudiada, se exploró en este estudio preliminar la implementación de un modelo estadístico supervisado como oPLS-DA. Este modelo incorpora la información correspondiente a las clases y permite, por lo tanto, clasificar las muestras de acuerdo a su clase y obtener una mejor discriminación entre las mismas que un modelo no supervisado como PCA. La Figura 49 muestra el gráfico de *scores* de las dos primeras variables latentes (VL) del modelo de oPLS-DA, el cual utilizó 6 VL para representar el 99% de la varianza acumulada. La primera de las variables (*Scores* en VL1, Figura 49) está relacionada con la variabilidad entre las clases (CS vs CCRcc) y acumula el 88,39% de la varianza total, mientras que la segunda variable (*Scores* en VL2, Figura 49) está relacionada con la variabilidad obtenida dentro de cada clase.

Los valores obtenidos de  $R^2Y=0,9985$  y  $Q^2=0,9956$  (por validación cruzada), que son parámetros de calidad del modelo de oPLS-DA, demuestran un muy buen ajuste y predicción de clases, respectivamente. Otra medida de la bondad del modelo utilizado para predecir la enfermedad que valida estos resultados es el buen ajuste obtenido para la comparación de los valores predichos por el modelo con los valores obtenidos por el modelo para la clase correspondiente a pacientes enfermos con CCRcc (EIV), ilustrado en la Figura 50.

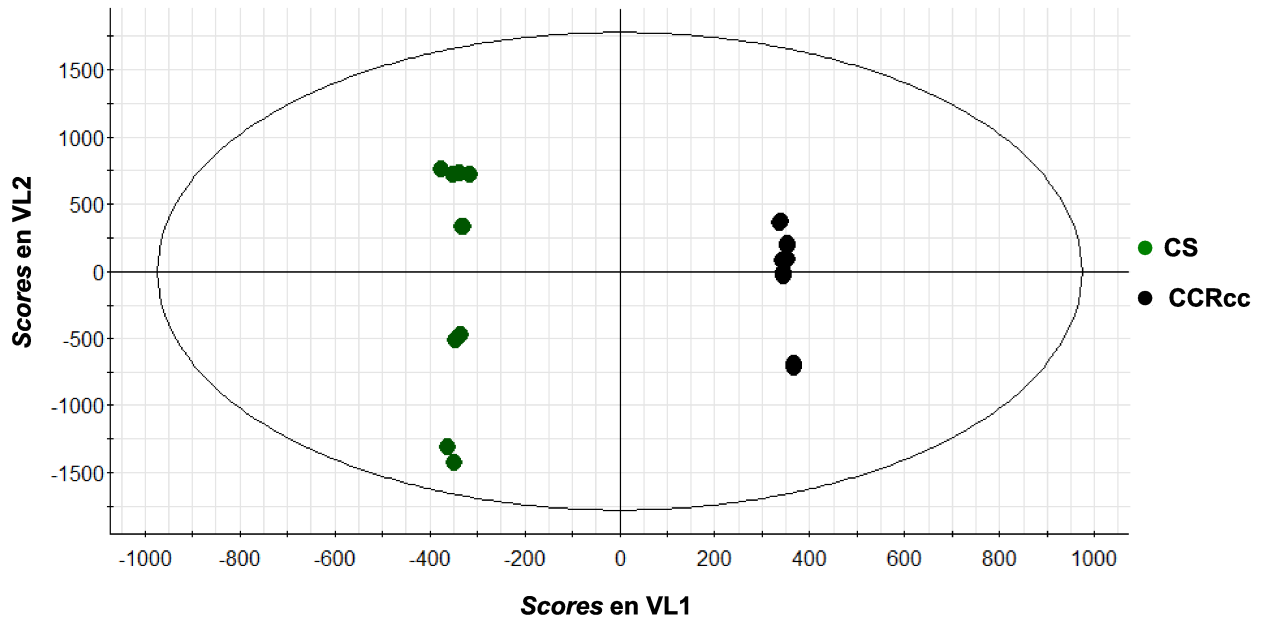


Figura 49: Análisis de oPLSA-DA.

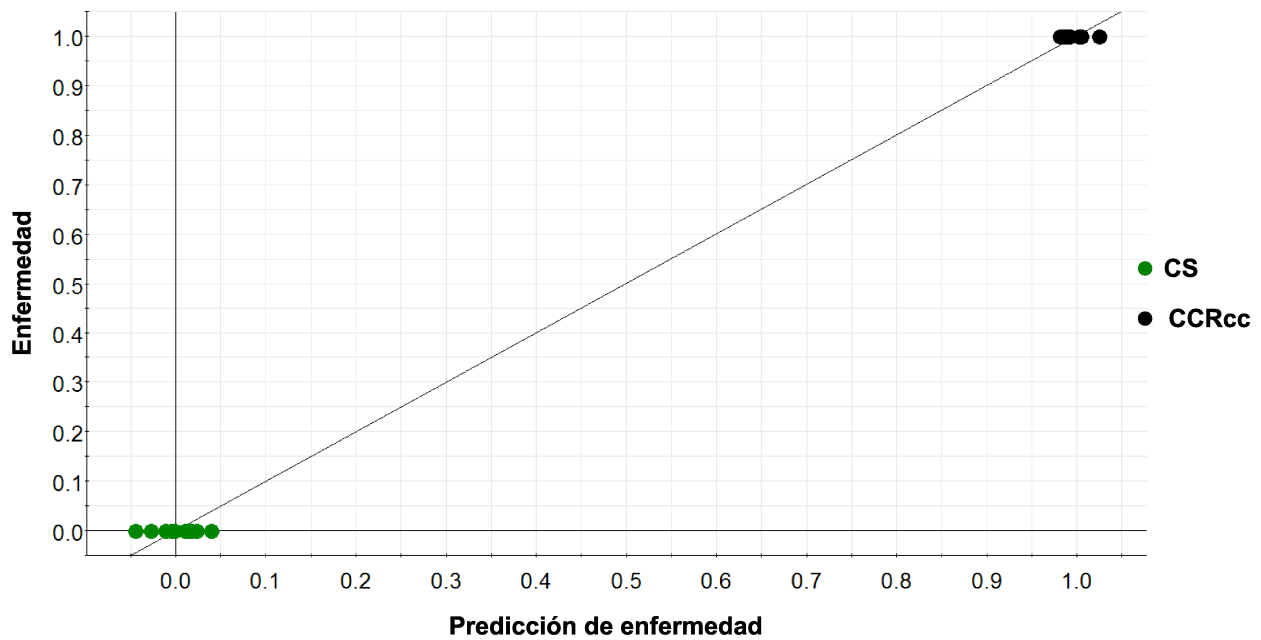


Figura 50: Valores de predicción para muestras de pacientes enfermos.

En base a la observación del gráfico S-Plot, que se muestra en la Figura 51, se seleccionaron las variables con mayores valores absolutos de *loadings* de covarianza y correlación.



Estas variables se ubican en el gráfico en el cuadrante superior derecho y en el inferior izquierdo y corresponden a aquellos pares  $t_r$ - $m/z$  con mayor poder discriminante entre clases. De esta forma, se determinó un panel de 10 variables discriminantes cuyos valores de intensidad promedio difieren significativamente entre las clases (Figura 52). De las 2.587 variables extraídas inicialmente en los perfiles metabólicos de las muestras, mediante esta metodología, se logró reducir la dimensión del problema e identificar aquellas variables que permiten la discriminación de clases.

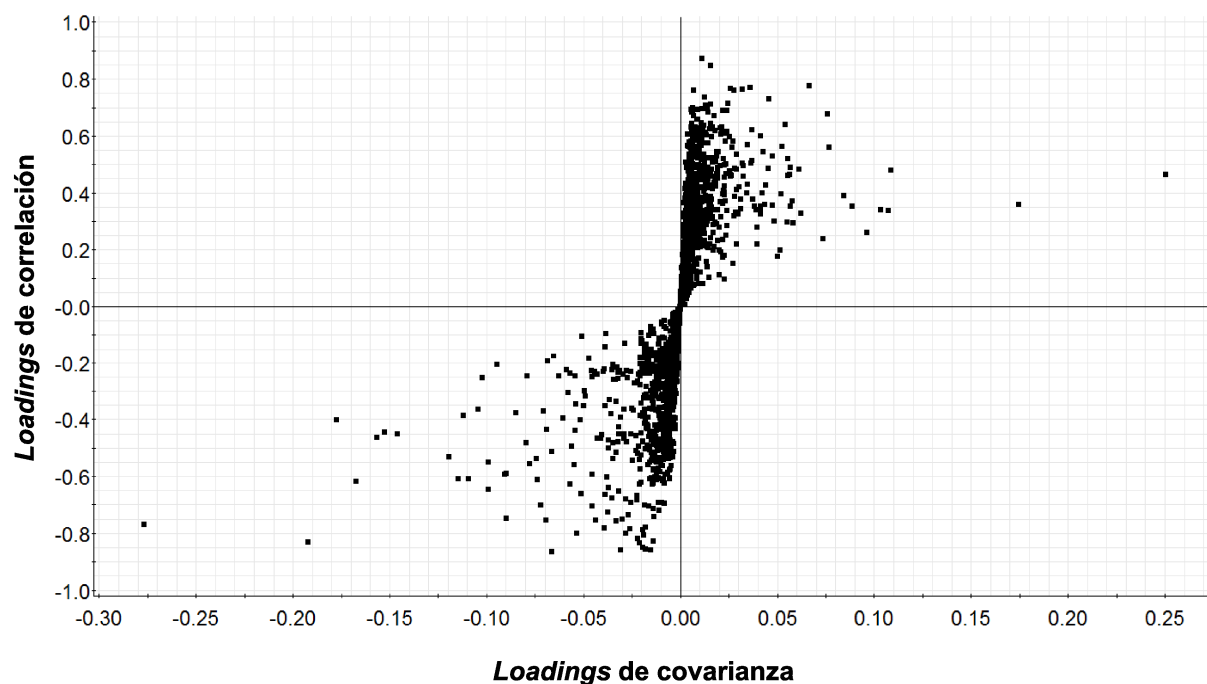


Figura 51: S-Plot. *Loadings* de covarianza vs *Loadings* de correlación (Control=-1; Enfermedad=1).

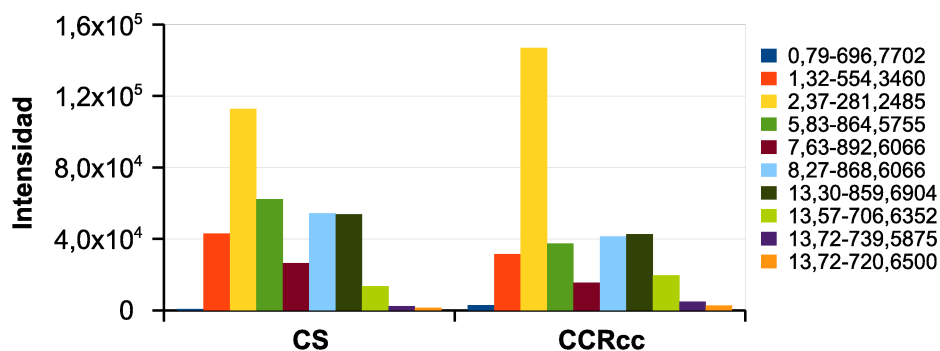


Figura 52: Intensidad de señales para las variables discriminantes “pares  $t_r$  (min.)- $m/z$ ”

Una vez identificado el panel de variables discriminantes, se procedió a su identificación tentativa mediante la búsqueda de los valores de  $m/z$  obtenidos con alta resolución en bases de datos de metabolómica de acceso libre como METLIN y HMDB. La tabla XXXIII muestra los resultados obtenidos para esta búsqueda, indicando las especies iónicas detectadas (que se forman durante el proceso de ionización en la fuente del espectrómetro de masas) e informando el error correspondiente a la diferencia de masa (son todas especies monocargadas) entre el valor de  $m/z$  experimental y el valor de  $m/z$  correspondiente a la especie iónica asociada a la fórmula molecular propuesta para M (M=metabolito). La identificación es tentativa ya que no se efectuaron experimentos de MS en tándem ni se analizaron estándares para validar estas identidades. De hecho, existen muchos isómeros estructurales para la mayoría de las fórmulas moleculares propuestas y en esos casos se indican las familias de compuestos a las que pertenecen estos potenciales biomarcadores de la enfermedad. De todas formas, la identificación tentativa de los metabolitos discriminantes, sugiere alteraciones en el metabolismo de los lípidos.

$t_r$ - $m/z$ experimental	Especie iónica detectada	Fórmula molecular de M	$\Delta m$ (mDa)	Valor p	Identificación tentativa de M
0,79-696,7702	[M-H] <sup>-</sup>	-	-	0,001	-
1,32-554,3460	[M+Cl] <sup>-</sup>	C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	44,1	0,05	(LyP) Lisofosfolípido
2,37-281,2485	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	0,1	0,03	Ácido oleico
5,83-864,5755	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>48</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>10</sub> P	0,5	7x10 <sup>-05</sup>	(PE) Fosfatidiletanolamina
7,63-892,6066	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>50</sub> H <sub>88</sub> NO <sub>10</sub> P	0,7	7x10 <sup>-06</sup>	(PE) Fosfatidiletanolamina
8,27-868,6066	[M+Cl] <sup>-</sup>	C <sub>48</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>8</sub> P	43,7	0,04	(PC) Fosfatidilcolina
13,30-859,6904	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>56</sub> H <sub>92</sub> O <sub>6</sub>	8,2	0,004	(TG) Triglicérido
13,57-706,6352	[M-H] <sup>+</sup>	-	-	0,04	-
13,72-739,5875	[M+Cl] <sup>-</sup>	C <sub>48</sub> H <sub>80</sub> O <sub>3</sub>	7,4	0,01	(CE) Ester de colesterol
13,72-720,6500	[M-H] <sup>-</sup>	-	-	5x10 <sup>-05</sup>	-

Tabla XXXIII: Identificación química tentativa de las variables discriminantes.

Por último, y a modo ilustrativo, la Figura 53 muestra el cromatograma iónico extraído y el espectro de masas asociado a una de las variables discriminantes, (7,63 min –  $m/z$  892,6066) para uno de los CS y un paciente con CCRcc.

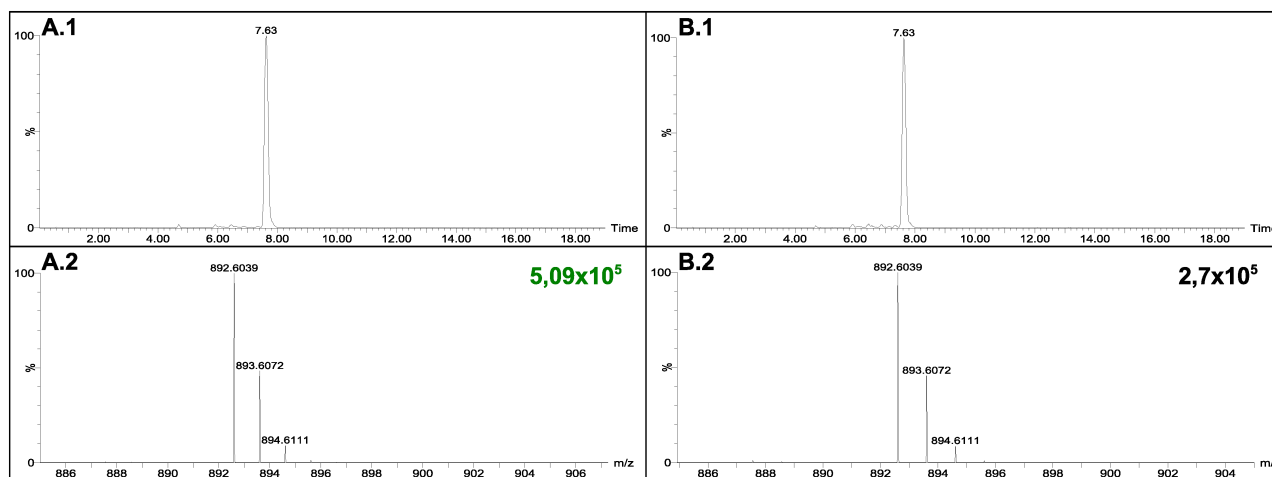


Figura 53: Cromatograma iónico extraído (1) y espectro de masas asociado (2) de la variable (7,63-892,6066) para una sola muestra de (A) CS y (B) paciente con CCRcc EIV. En los espectros de masas se indican, en el ángulo superior derecho los valores de intensidad de la señal de los iones más abundantes.

## **CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN PARCIAL**

En este estudio metabolómico preliminar se analizaron muestras de suero de 5 controles sanos y 5 pacientes con CCRcc EIV. En base a experiencia previa del grupo de investigación del CIBION y de otros autores (273–275), se optimizó un método de extracción de metabolitos y un método de UPLC-MS que permitió la óptima separación de los componentes no proteicos de los sueros estudiados. Una vez extraídos los perfiles metabólicos, se implementó un método de análisis estadístico multivariado supervisado (oPLSA-DA) que permitió clasificar satisfactoriamente las muestras de acuerdo a sus clases y, a partir de este análisis, se obtuvo un panel de variables metabólicas discriminantes, cuyas señales difirieron significativamente entre las clases. Si bien es difícil sacar conclusiones de los resultados obtenidos por la limitación asociada al número reducido de muestras analizado, es importante destacar que la mayoría de las variables discriminantes encontradas pertenecen a la familia de los lípidos. En concordancia con nuestros resultados preliminares, en 1987, Gebhard *et al.* observaron que los tumores CCRcc almacenan grandes cantidades de colesterol y principalmente ésteres de colesterol (23). También, Matsumoto *et al.* observaron un aumento de la actividad de la enzima Acil-coenzima A colesterol aciltransferasa (ACAT), responsable de la esterificación del colesterol, y un aumento de la expresión de la isoforma ACAT-1 en tumores con CCRcc (24). Además, Horiguchi *et al.* informaron que la sobreexpresión del complejo enzimático FAS, *Fatty Acid Synthase*, que cataliza la síntesis de palmitato a partir de acetil-CoA y manoil-CoA, primer paso del proceso de síntesis de ácidos grasos, estaba asociada con peor pronóstico en pacientes con CCRcc (276). Todas estas evidencias reafirman la hipótesis de que el CCRcc es una enfermedad metabólica, pero también sugieren que este tumor presenta una clara disfunción en el metabolismo lipídico y del colesterol. Recientemente, se realizó un estudio metabolómico en suero de 30 pacientes con CCRcc combinando cromatografía en fase reversa, tal como se utilizó en el presente estudio, y HILIC (*hydrophilic interaction liquid chromatography*, que optimiza la separación de compuestos altamente polares). En el mismo se informó el hallazgo de 30 potenciales biomarcadores, entre los cuales se destacan las lisofosfatidilcolinas reforzando la hipótesis de la desregulación del catabolismo lipídico en CCRcc (277).

Si bien este estudio es preliminar, el mismo permitió establecer un método analítico de UPLC-MS para optimizar la separación y detección de los componentes metabólicos del suero, obteniéndose resultados preliminares promisorios. El método desarrollado en este estudio se utilizará en el CIBION para llevar a cabo un proyecto más global que involucra el análisis de un mayor número de muestras (n = 200) que incluyen CS y pacientes con los distintos estadios de la

enfermedad, para el descubrimiento de biomarcadores metabólicos con utilidad clínica, con fines de diagnóstico, pronóstico y de seguimiento del paciente; así como también para ampliar el conocimiento sobre las vías metabólicas alteradas durante la progresión tumoral.

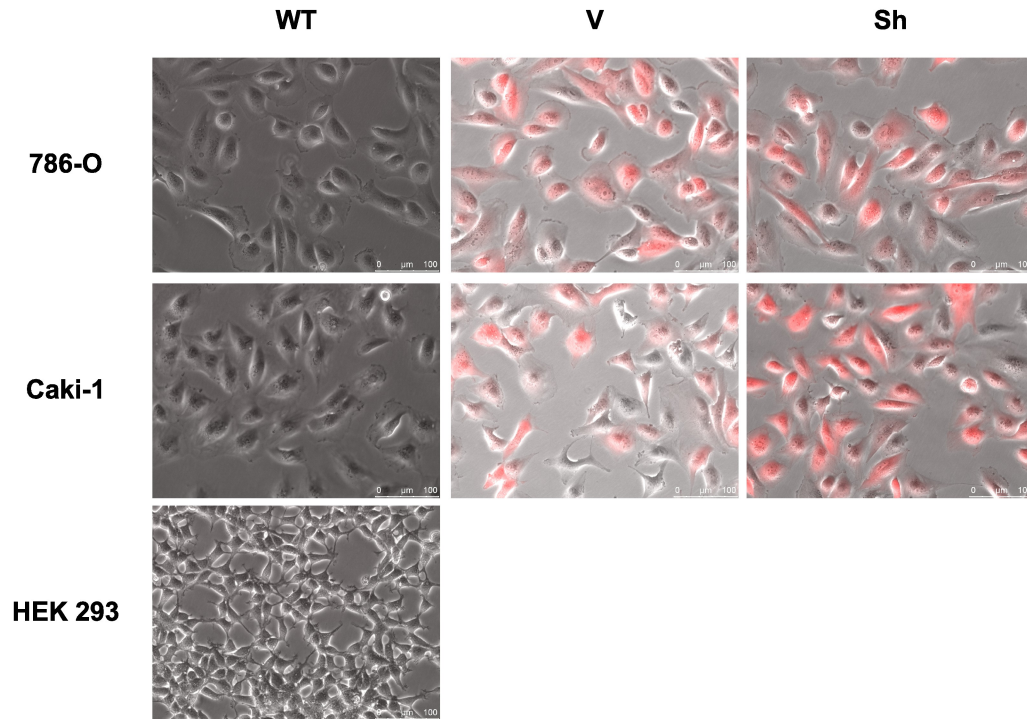
## **ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE SIRT6 Y SU ASOCIACIÓN CON EL METABOLISMO EN CÉLULAS DE CARCINOMA RENAL CCRcc**

Para evaluar el rol de SIRT6 en el metabolismo de células de tumor CCRcc se realizaron una serie de experimentos usando como estrategia el silenciamiento de SIRT6 y se estudió su efecto en la expresión de enzimas glucolíticas y en la incorporación de glucosa. Para esto se utilizaron las líneas celulares 786-O y Caki-1 ambas derivadas de CCRcc humano y HEK 293 derivadas de riñón de embrión humano, como control. Las células 786-O no expresan la proteína VHL por lo que representan el 90% de los tumores CCRcc, mientras que las células Caki-1 expresan la proteína VHL WT y representan el 10% restante de los tumores CCRcc.

Este estudio se desarrolló mayoritariamente en el *MGH Cancer Center* bajo la dirección del Dr. Raúl Mostoslavsky y su equipo de trabajo.

Se decidió comenzar por el silenciamiento de SIRT6 puesto que, resultados previos de nuestro laboratorio, indicaron que todas las líneas celulares en estudio expresan la enzima. Para esto se utilizó la técnica del ShARN que permite un silenciamiento estable a nivel del ARNm. Se utilizó un plásmido inducible con doxiciclina y que, además de la expresión del ShARN de SIRT6, expresa RFP, (*Red Fluorescence Protein*), que permite identificar cuándo está activo el sistema.

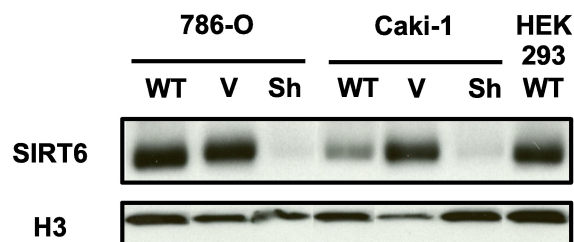
La Figura 54 muestra las 3 líneas celulares 786-O, Caki-1 y HEK 293 parentales, no infectadas (WT) y las infectadas con el plásmido vector (V) o con ShARN SIRT6 (Sh) que poseen activo el sistema de silenciamiento lo se comprueba por observación de la proteína RFP con un microscopio de fluorescencia. Como se observa en la figura, la mayoría de las células infectadas tienen el sistema inducido. Además, la infección no modificó la morfología celular ni la velocidad de crecimiento.



**Figura 54:** Fotos representativas de las líneas celulares WT y de las líneas infectadas inducidas.

Posteriormente, se estudio la expresión de SIRT6 a nivel de proteína en las diferentes líneas. En la Figura 55 se muestra el resultado de un WB representativo donde se observa que las líneas parentales y V expresan SIRT6, mientras que las líneas Sh no lo hacen, comprobando su silenciamiento. Sin embargo, se pudo observar un aumento en la expresión de la proteína en la línea Caki-1 V, probablemente inducido por la infección viral.

Con estos resultados puede concluirse que el sistema de plásmidos utilizados es efectivo para silenciar la proteína SIRT6 aunque la infección viral en las células Caki-1 V pareciera afectar, al menos, la expresión endógena de la enzima SIRT6.

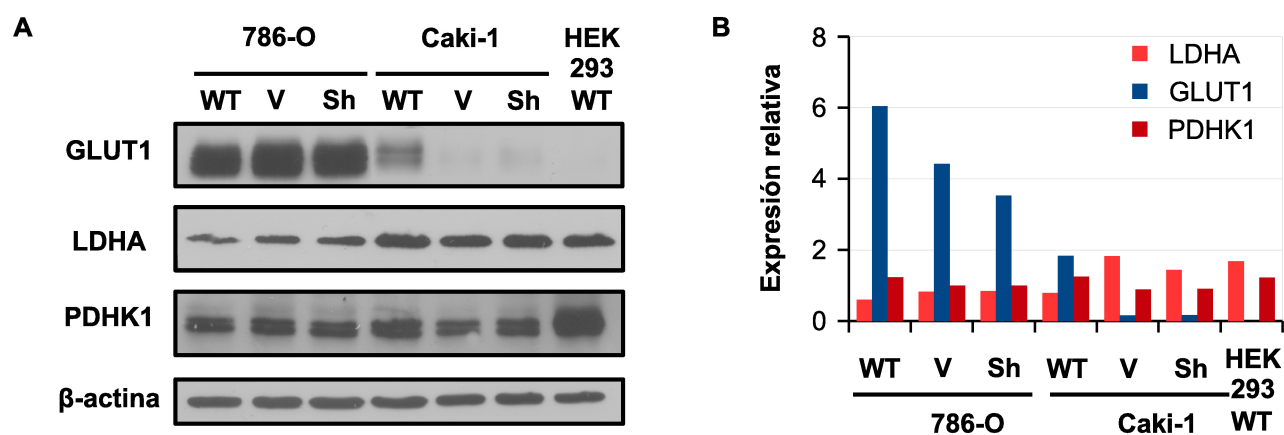


**Figura 55:** WB representativo que revela la expresión de SIRT6 en las distintas líneas celulares de riñón humano. Se comprueba el silenciamiento en las líneas Sh. Como control de carga se evaluó la expresión de la histona H3.

Se estudió, entonces, la expresión de GLUT1, y de las enzimas involucradas en la glucólisis: LDHA y PDHK1. La Figura 56 muestra un WB representativo y su cuantificación respectiva. Se observa que GLUT1 se expresa diferencialmente en las 3 líneas. Las dos líneas de carcinoma renal expresan el transportador GLUT1, siendo las células 786-O las que lo expresan en mayor cantidad. También se observa que la línea no tumoral, HEK 293, no expresa GLUT1. En la células 786-O V y Caki-1 V se observa una disminución de la expresión del transportador de glucosa, que llega a niveles indetectables en la línea Caki-1 V. Esta disminución podría estar provocada por la infección viral.

Con respecto a las enzimas glucolíticas, se puede observar que las células 786-O expresan menor cantidad de LDHA que el resto de las líneas, sin evidencias de diferencias de expresión con respecto a las líneas V y Sh. La expresión de LDHA no se modificó por la infección en las células Caki-1.

Por último, las células HEK 293 expresan mayores cantidades de la enzima PDHK1. La expresión de esta enzima fue similar entre las dos líneas de carcinoma renal; y no se altera en las líneas V y Sh.



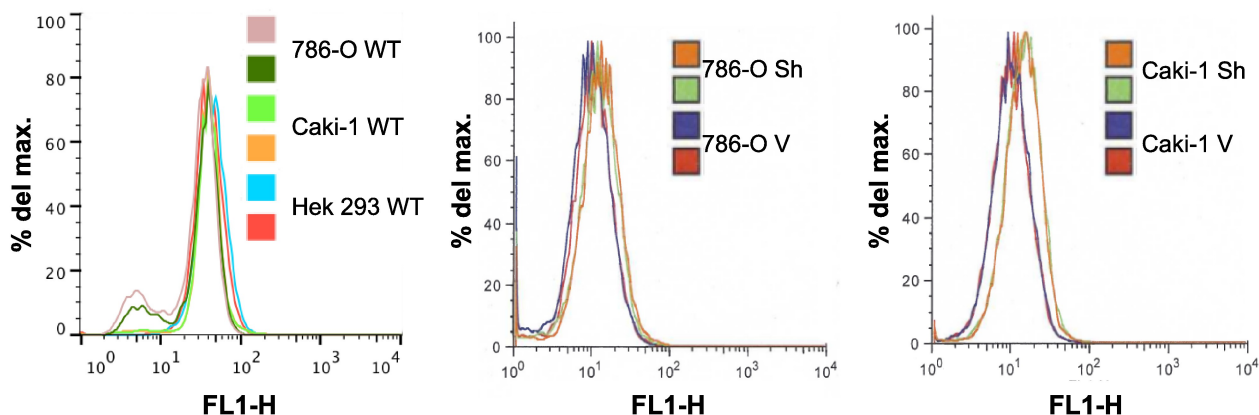
**Figura 56:** Derecha: WB representativo que revela la expresión de GLUT1 y las enzimas glucolíticas, LDHA y PDHK1 en las líneas estudiadas. Como control de carga se evaluó la expresión de β-actina (se expone sólo una a modo representativo). Izquierda: cuantificación de las bandas de los WB.

Sabiendo que la glucosa es el principal nutriente que utilizan las células para obtener energía y precursores de las biomoléculas y que una vez incorporada es degradada en la glucólisis por enzimas específicas, se quiso determinar si existen variaciones basales en la incorporación de glucosa entre las líneas parentales renales y el efecto del silenciamiento de SIRT6.



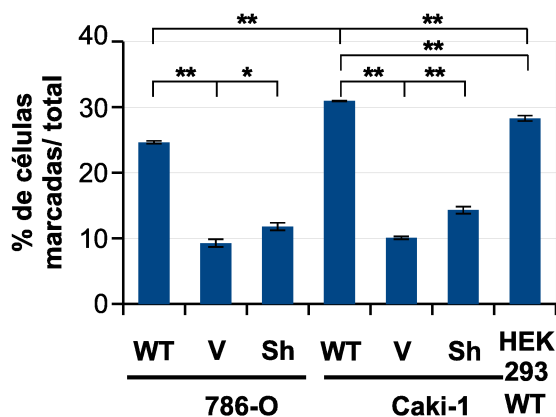
Para realizar este estudio se llevó a cabo un ensayo que combina la incubación de las células con glucosa marcada (2-NBDG) y su posterior detección por citometría de flujo.

En la Figura 57 se muestran resultados representativos del ensayo para las líneas WT y las Sh y V de 786-O y Caki-1.



**Figura 57:** Histogramas de citometría de flujo representativos del ensayo de incorporación de glucosa para las líneas WT, Sh y V.

Los resultados preliminares se muestran en las Figura 58. Se observan diferencias significativas en la incorporación de glucosa entre las líneas parentales. También se observan diferencias significativas en la incorporación de glucosa de las células parentales con respecto a las células V lo que, junto a la observación de una expresión diferencial de GLUT1 y SIRT6 (esta sólo en las células Caki-1) permite hipotetizar que la infección viral genera un cambio metabólico en las líneas estudiadas. A pesar de esto, se observó un aumento significativo en la incorporación de glucosa en ambas líneas Sh con respecto a sus respectivas líneas V.



**Figura 58:** Ensayo de incorporación de glucosa para las células WT, V y Sh. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

## **CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN PARCIAL**

A fin de estudiar el efecto de SIRT6 en la glucólisis de células de Carcinoma Celular Renal de células claras se intentó, en una primera etapa, desarrollar un modelo utilizando la estrategia de ShARN, que permite un silenciamiento estable de la proteína a nivel de ARNm. Para tal fin se emplearon dos líneas establecidas de CCRcc, que expresan SIRT6 y que tienen diferente *background* genético, y una línea de riñón no tumoral como control. Fue posible infectar y seleccionar las células con alta eficiencia. Las células respondieron bien a la inducción con doxíciclina y al silenciamiento de SIRT6. Mediante WB se determinó que la expresión de SIRT6 disminuyó a niveles no detectables.

Una vez establecido el modelo se estudió la expresión de GLUT1, y de las enzimas involucradas en la glucólisis: LDHA y PDHK1. No se observaron diferencias en la expresión del transportador de glucosa GLUT1, ni en la expresión de las enzimas glucolíticas LDHA y PDHK1 entre las células infectadas con el plásmido vacío y las infectadas con el plásmido ShSIRT6. A pesar de esto, sí se observaron diferencias significativas en la incorporación de glucosa, siendo las células silenciadas las que incorporan mayores cantidades.

La disminución en la incorporación de glucosa en las células Caki-1 Sh y V con respecto a las células parentales, podría asociarse con la menor expresión de GLUT1. Sin embargo, es difícil poder sacar claras conclusiones en relación a SIRT6 ya que la infección de las células Caki-1 provoca un aumento *per se* en la expresión de la desacetilasa y una disminución de la expresión de GLUT1 al igual que de la incorporación de glucosa. Este cambio en la expresión de SIRT6 y GLUT1 en las células V con respecto a las parentales podría deberse a que la infección haya generado cambios genéticos debidos a, por ejemplo, una translocación errónea o a un alto título viral. No obstante, se observó un aumento significativo en la incorporación de glucosa en la células Sh con respecto a las células V.

Para el caso de las células 786-O el silenciamiento de SIRT6 también disminuyó la expresión de GLUT1 aunque en menor medida, ya que las células V y Sh siguen expresando grandes cantidades del transportador si se compara con el resto de las células estudiadas. Sin embargo, también se observa disminución significativa en la incorporación de glucosa en las células V, luego de la infección viral. A pesar de esto, el silenciamiento de SIRT6 también provocó un aumento significativo en la incorporación de glucosa. En estas células, el silenciamiento de SIRT6 pareciera aumentar la actividad del transportador ya que aumenta significativamente la incorporación de glucosa en las células Sh a pesar de la expresión disminuida de GLUT1.

Las células HEK 293 incorporan grandes cantidades de glucosa, si se comparan con las líneas V y Sh, a pesar de que no poseen niveles detectables por WB, de GLUT1.

En este sentido, es sabido que la incorporación de glucosa está condicionada por su disponibilidad y por la expresión de sus transportadores. Como se mencionó anteriormente, la familia de transportadores GLUT está formada por varios miembros. Se ha reportado que, GLUT1 y GLUT3 se encuentran sobreexpresados en cáncer de mama y endometrial (278). Incluso, Younges *et al.* ya habían observado, en 1997, que en algunos tumores se expresa GLUT3 pero no en los tejidos sanos correspondientes (279). Por lo tanto, sería interesante estudiar qué sucede con este otro miembro de la misma familia GLUT en el contexto de SIRT6 silenciado.

Un punto importante a estudiar, una vez definido el modelo adecuado, es la relación de SIRT6 con HIF2 $\alpha$ , ya que no hay datos bibliográficos al respecto. En este sentido, las células 786-O podrían usarse como modelo ya que está reportado que, en condiciones de normoxia, expresan sólo HIF2 $\alpha$  y que los niveles aumentan en condiciones de hipoxia (280,281). En el caso de las células Caki-1, no hay evidencias claras sobre los niveles de expresión de las isoformas de HIF, aunque se ha reportado que expresan tanto HIF1 $\alpha$  como HIF2 $\alpha$  sólo en condiciones de hipoxia (282).

Raval *et al.* estudiaron el efecto de la sobreexpresión de HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  en células 786-O y Caki-1. Los autores observaron que las 786-O dejan de expresar GLUT1 y HIF2 $\alpha$  cuando sobreexpresan HIF1 $\alpha$ . Por el contrario, cuando sobreexpresan HIF2 $\alpha$ , los niveles de expresión de GLUT1 son incluso mayores que los de las líneas WT. Los autores concluyen que, en la línea 786-O, que no expresa la proteína VHL, la sobreexpresión de cualquiera de las isoformas excluye a la otra y sus efectos. Las células Caki-1 sí expresan GLUT1 al sobreexpresar HIF1 $\alpha$  pero expresan aún mayores niveles al sobreexpresar HIF2 $\alpha$ . Los autores atribuyen esta diferencia a la expresión diferencial de la proteína VHL en estas líneas (226).

Es posible que la sobreexpresión de SIRT6, en estas líneas celulares, dé resultados más contundentes que el silenciamiento ya que, si las células poseen una vía glucolítica muy activa *per se*, podrían necesitarse altos niveles de SIRT6 para revertir el efecto. Otro punto a considerar es realizar cultivos celulares en condiciones de hipoxia, lo que activaría aún más la vía de HIF.

Tampoco puede descartarse la hipótesis de que, si bien las dos líneas CCRcc expresan SIRT6, ésta podría no ser funcional por poseer alguna mutación puntual, aunque todavía no han sido descritas mutaciones de SIRT6 en ningún tipo tumoral. En este contexto, el silenciamiento no produciría cambios biológicos significativos.

Por último, hasta el momento, no hay trabajos que hayan evaluado los niveles de expresión de SIRT6 en tumores renales. Si bien se trata de solo dos líneas celulares en este trabajo se

observó que la línea CCRcc Caki-1 ( $V^{HL+}/+$ ) expresa niveles menores de SIRT6 que la línea 786-O ( $V^{HL-}/-$ ).

Los resultados sobre el rol de SIRT6 en CCRcc, obtenidos en este trabajo, son preeliminares, pero dejan nuevas preguntas concernientes a reconsiderar el modelo empleado y al uso de nuevas herramientas experimentales.

## DISCUSIÓN FINAL

El Carcinoma Celular Renal de células claras (CCRcc) es una enfermedad que se caracteriza por presentar desregulación del metabolismo celular, en particular de lípidos y colesterol, y en las vías involucradas en el proceso angiogénico. Estas características la convierten en una enfermedad cuya evolución es difícil de predecir. Hoy en día todavía no se cuenta, en la clínica, con biomarcadores que ayuden a diagnosticar y evaluar el pronóstico de los pacientes con esta enfermedad.

En este trabajo se estudió el valor como biomarcador diagnóstico y pronóstico del transportador de glucosa tipo 1 (GLUT1) y la Anhidrasa Carbónica IX (CAIX) en tejido tumoral y de CAIX y el Factor de Crecimiento Fibroblástico 21 (FGF21) en suero de pacientes con Carcinoma de Células Renales de células claras (CCRcc). Las tablas XXXI y XXXII resumen los resultados obtenidos para las tres moléculas estudiadas.

Una expresión elevada de GLUT1 en la membrana de las células tumorales, demostró ser indicadora de peor pronóstico en términos de supervivencia libre de enfermedad (SLE) de manera independiente de otros parámetros pronóstico utilizados hoy en día en la clínica como el estadio y el grado nuclear o de Fuhrman. La baja expresión de CAIX en membrana se asoció con la presencia de metástasis al diagnóstico.

Las concentraciones séricas de la enzima CAIX (CAIXs), y de FGF21 (FGF21s), están aumentadas en los pacientes portadores de CCRcc respecto a la población control. Una elevada expresión de FGF21s, se asoció con menor SLE de manera independiente del estadio y el grado nuclear de Fuhrman. A su vez, una elevada expresión de CAIXs se asoció con peor supervivencia global de manera independiente del grado nuclear pero no del estadio.

Tanto el tejido tumoral como el suero de los pacientes aportó información de relevancia que de continuar siendo evaluada y estudiada en un número mayor de pacientes y en otras poblaciones podría utilizarse en la clínica para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes. Es importante destacar que los biomarcadores estudiados en este trabajo fueron analizados por diferentes metodologías estadísticas uni y multivariada, tal que los resultados obtenidos dan una plataforma confiable para ahondar los estudios a futuro.

El estudio de las moléculas circulantes es un baluarte promisorio en el campo de los biomarcadores y en particular en el campo de la oncología. El suero es una fuente rica de información, muy poco invasiva, que refleja el comportamiento del tumor (de las células tumorales, su entorno estromático, estructuras vasculares y, células convocadas de la médulas ósea o del sistema inmune) y permite evaluar al paciente durante el transcurso de la enfermedad. Los avances

metodológicos para el análisis de las múltiples moléculas circulantes, sumado al uso de nueva metodología computacional para el análisis de cientos/miles de datos simultáneamente, prometen generar avances concretos en el descubrimiento de nuevos biomarcadores. Esta información será complementaria a la obtenida en el tejido tumoral, no sólo para el diagnóstico y la evaluación del pronóstico del paciente sino que también para establecer la terapia y posibilitar el seguimiento.

Otra estrategia promisorio es el empleo de plataformas de análisis de múltiples moléculas en forma simultánea como la proteómica, la metabolómica y el resto de las “ómicas”, lo que permitirá encontrar paneles de biomarcadores que colaboren con el diagnóstico, pronóstico y la llegada de la medicina personalizada, tan importante en el tratamiento de una enfermedad tan compleja como es el cáncer en general, y el cáncer renal en particular.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000;100:57–70.
2. Nagy JA, Chang S-H, Shih S-C, Dvorak AM, Dvorak HF. Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin Thromb Hemost*. 2010 Apr;36(3):321–31.
3. Baluk P, Hashizume H, McDonald DM. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2005 Feb;15(1):102–11.
4. Hess AR, Seftor EA, Gardner LM, Carles-Kinch K, Schneider GB, Seftor RE, et al. Molecular regulation of tumor cell vasculogenic mimicry by tyrosine phosphorylation: role of epithelial cell kinase (Eck/EphA2). *Cancer Res*. 2001 Apr 15;61(8):3250–5.
5. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*. 2002 Aug;2(8):563–72.
6. Hanahan D, Weinberg R a. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. Elsevier Inc.; 2011;144(5):646–74.
7. Torre L a., Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-tieulent J, Jemal A. Global Cancer Statistics, 2012. *CA a cancer J Clin*. 2015;65(2):87–108.
8. Dra. M. Graciela Abriata, Lic. Lisa F. Roques, Dr. Guillermo Macías DDL. Atlas de Mortalidad por Cáncer Argentina 2007-2011. 2011;29–44.
9. Cohen HT, MCGovern FJ. Renal-Cell Carcinoma. 2005;2477–90.
10. Cheng L, Williamson SR, Zhang S, MacLennan GT, Montironi R, Lopez-Beltran A. Understanding the molecular genetics of renal cell neoplasia: implications for diagnosis, prognosis and therapy. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2010;10(6):843–64.
11. Shuch B, Amin A, Armstrong AJ, Eble JN, Ficarra V, Lopez-Beltran A, et al. Understanding Pathologic Variants of Renal Cell Carcinoma: Distilling Therapeutic Opportunities from Biologic Complexity. *Eur Urol. European Association of Urology*; 2015;67(1):85–97.
12. Pautas en Oncología. Instituto de Oncología 'Angel H. Roffo'. 2010.
13. Pinthus JH, Whelan KF, Gallino D, Lu JP, Rothschild N. Metabolic features of clear-cell renal cell carcinoma: Mechanisms and clinical implications. *J Can Urol Assoc*. 2011;5(4):274–82.
14. Linehan WM, Srinivasan R, Schmidt LS. The genetic basis of kidney cancer: a metabolic disease. *Nat Rev Urol*. 2010 May;7(5):277–85.
15. Banks RE, Tirukonda P, Taylor C, Hornigold N, Astuti D, Cohen D, et al. Genetic and epigenetic analysis of von Hippel-Lindau (VHL) gene alterations and relationship with clinical variables in sporadic renal cancer. *Cancer Res*. 2006 Feb 15;66(4):2000–11.
16. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999;399(6733):271–5.
17. Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L. Regulation of the Hypoxia-inducible Transcription Factor 1 by the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *J Biol Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology*; 1999 Mar 5;274(10):6519–25.
18. Gordan JD, Bertout J a., Hu CJ, Diehl JA, Simon MC. HIF-2 Promotes Hypoxic Cell Proliferation by Enhancing c-Myc Transcriptional Activity. *Cancer Cell*. 2007;11(4):335–47.
19. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science (80- )*. 2009 May 22;324(5930):1029–33.
20. Godinot C, De Laplanche E, Hervouet E, Simonnet H. Actuality of Warburg's views in our understanding of renal cancer metabolism. *J Bioenerg Biomembr*. 2007;39(3):235–41.
21. Gatenby R a, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer*. 2004;4(11):891–9.
22. Stillebroer AB, Mulders PF a, Boerman OC, Oyen WJG, Oosterwijk E. Carbonic anhydrase IX in renal cell carcinoma: implications for prognosis, diagnosis, and therapy. *Eur Urol. European Association of Urology*; 2010;58(1):75–83.

23. Gebhard RL, Clayman R V, Prigge WF, Figenshau R, Staley N a, Reese C, et al. Abnormal cholesterol metabolism in renal clear cell carcinoma. *J Lipid Res.* 1987;28(10):1177–84.
24. Matsumoto K, Fujiwara Y, Nagai R, Yoshida M, Ueda S. Expression of two isozymes of acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase-1 and -2 in clear cell type renal cell carcinoma. *Int J Urol.* 2008 Feb;15(2):166–70.
25. Sun Q, Chen X, Ma J, Peng H, Wang F, Zha X, et al. Mammalian target of rapamycin up-regulation of pyruvate kinase isoenzyme type M2 is critical for aerobic glycolysis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(10):4129–34.
26. Ferrara N, Gerber HP. The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol.* 2001 Jan;106(4):148–56.
27. Yamakawa M. Expression of angiopoietins in renal epithelial and clear cell carcinoma cells: regulation by hypoxia and participation in angiogenesis. *AJP Ren Physiol.* 2004 Oct 1;287(4):F649–57.
28. Ramankulov A, Lein M, Kristiansen G, Meyer H-A, Loening S a, Jung K. Elevated plasma osteopontin as marker for distant metastases and poor survival in patients with renal cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2007;133(9):643–52.
29. Varela I, Tarpey P, Raine K, Huang D, Ong CK, Davies H, et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. 2011;469(7331):539–42.
30. Salvi A, Marchina E, Benetti A, Grigolato P, De Petro G, Barlati S. Germline and somatic c-met mutations in multifocal/bilateral and sporadic papillary renal carcinomas of selected patients. *Int J Oncol.* 2008;33(5):271–6.
31. Steffan JJ, Coleman DT, Cardelli J a. The HGF-met signaling axis: emerging themes and targets of inhibition. *Curr Protein Pept Sci.* 2011;12(1):12–22.
32. Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S, Comoglio PM. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell.* 2003;3(4):347–61.
33. Bjornsson J, Short MP, Kwiatkowski DJ, Henske EP. Tuberous sclerosis-associated renal cell carcinoma. Clinical, pathological, and genetic features. *Am J Pathol.* 1996;149(4):1201–8.
34. Klomp J a, Petillo D, Niemi NM, Dykema KJ, Chen J, Yang XJ, et al. Birt-Hogg-Dubé renal tumors are genetically distinct from other renal neoplasias and are associated with up-regulation of mitochondrial gene expression. *BMC Med Genomics.* BioMed Central Ltd; 2010;3(1):59.
35. Tong W-H, Sourbier C, Kovtunovych G, Jeong SY, Vira M, Ghosh M, et al. The Glycolytic Shift in Fumarate-Hydratase-Deficient Kidney Cancer Lowers AMPK Levels, Increases Anabolic Propensities and Lowers Cellular Iron Levels. *Cancer Cell.* 2011 Sep;20(3):315–27.
36. Sudarshan S, Sourbier C, Kong H-S, Block K, Valera Romero V a, Yang Y, et al. Fumarate hydratase deficiency in renal cancer induces glycolytic addiction and hypoxia-inducible transcription factor 1 $\alpha$  stabilization by glucose-dependent generation of reactive oxygen species. *Mol Cell Biol.* 2009;29(15):4080–90.
37. Ricketts C, Woodward ER, Killick P, Morris MR, Astuti D, Latif F, et al. Germline SDHB mutations and familial renal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(17):1260–2.
38. Yan W, Herman JG, Guo M. Epigenome-based personalized medicine in human cancer. *Epigenomics.* 2015 Sep 7;
39. Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000 Aug 17;406(6797):747–52.
40. Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Sep 11;98(19):10869–74.
41. Campbell PJ, Stephens PJ, Pleasance ED, O'Meara S, Li H, Santarius T, et al. Identification of somatically acquired rearrangements in cancer using genome-wide massively parallel paired-end sequencing. *Nat Genet.* 2008 Jun;40(6):722–9.
42. D'Angelo G, Di Rienzo T, Ojetti V. Microarray analysis in gastric cancer: A review. *World J Gastroenterol.* 2014;20(34):11972.
43. Davalieva K, Kostovska IM, Kiprijanovska S, Markoska K, Kubelka-Sabit K, Filipovski V, et al. Proteomics analysis of malignant and benign prostate tissue by 2D DIGE/MS reveals new insights into proteins involved in prostate cancer. *Prostate.* 2015 Oct 12;75(14):1586–600.
44. Hu B, Niu X, Cheng L, Yang L-N, Li Q, Wang Y, et al. Discovering cancer biomarkers from clinical samples by protein microarrays. *PROTEOMICS - Clin Appl.* 2015;9(1-2):98–110.
45. Nicholson JK, Lindon JC. Systems biology: Metabonomics. *Nature.* 2008 Oct 23;455(7216):1054–6.



46. Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, et al. HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res.* 2007 Jan;35(Database issue):D521–6.
47. Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, Liu Y, et al. HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(Database issue):D801–7.
48. Rappaport SM, Smith MT. Epidemiology. Environment and disease risks. *Science.* 2010 Oct 22;330(6003):460–1.
49. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev.* Jan;26(1):51–78.
50. Pan Z, Raftery D. Comparing and combining NMR spectroscopy and mass spectrometry in metabolomics. *Anal Bioanal Chem.* 2006 Aug 12;387(2):525–7.
51. Bedair M, Sumner LW. Current and emerging mass-spectrometry technologies for metabolomics. *TrAC Trends Anal Chem.* 2008;27(3):238–50.
52. Drexler DM, Reilly MD, Shipkova PA. Advances in mass spectrometry applied to pharmaceutical metabolomics. *Anal Bioanal Chem.* 2011 Mar;399(8):2645–53.
53. Nishiumi S, Shinohara M, Ikeda A, Yoshie T, Hatano N, Kakuyama S, et al. Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for pancreatic cancer. *Metabolomics.* 2010;6(4):518–28.
54. García-Cañaveras JC, Donato MT, Castell J V, Lahoz A. A comprehensive untargeted metabolomic analysis of human steatotic liver tissue by RP and HILIC chromatography coupled to mass spectrometry reveals important metabolic alterations. *J Proteome Res.* 2011 Oct 7;10(10):4825–34.
55. Zhou M, Guan W, Walker LD, Mezencev R, Benigno BB, Gray A, et al. Rapid Mass Spectrometric Metabolic Profiling of Blood Sera Detects Ovarian Cancer with High Accuracy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010 Aug 10;19(9):2262–71.
56. Zhang A, Sun H, Wang P, Han Y, Wang X. Recent and potential developments of biofluid analyses in metabolomics. *J Proteomics.* 2012 Feb 2;75(4):1079–88.
57. Zhang A, Sun H, Wang X. Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for disease: a systematic review. *Anal Bioanal Chem.* 2012 May 31;404(4):1239–45.
58. Favretto D, Cosmi E, Ragazzi E, Visentin S, Tucci M, Fais P, et al. Cord blood metabolomic profiling in intrauterine growth restriction. *Anal Bioanal Chem.* 2012 Jan;402(3):1109–21.
59. Montrose DC, Zhou XK, Kopelovich L, Yantiss RK, Karoly ED, Subbaramaiah K, et al. Metabolic Profiling, a Noninvasive Approach for the Detection of Experimental Colorectal Neoplasia. *Cancer Prev Res.* 2012 Sep 7;5(12):1358–67.
60. Swartz ME. UPLC™: An Introduction and Review. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2005;28(7-8):1253–63.
61. Wild CP. Complementing the genome with an ‘exposome’: the outstanding challenge of environmental exposure measurement in molecular epidemiology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005 Aug;14(8):1847–50.
62. Zhou M, McDonald JF, Fernández FM. Optimization of a direct analysis in real time/time-of-flight mass spectrometry method for rapid serum metabolomic fingerprinting. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2010 Jan;21(1):68–75.
63. Himmelsbach M. 10 years of MS instrumental developments--impact on LC-MS/MS in clinical chemistry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012 Feb 1;883-884:3–17.
64. Wilson ID, Plumb R, Granger J, Major H, Williams R, Lenz EM. HPLC-MS-based methods for the study of metabolomics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005 Mar 5;817(1):67–76.
65. Truong LD, Shen SS. Immunohistochemical diagnosis of renal neoplasms. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(1):92–109.
66. Valera V a., Li-Ning-T E, Walter B a., Roberts DD, Linehan WM, Merino MJ. Protein expression profiling in the spectrum of renal cell carcinomas. *J Cancer.* 2010;1(1):184–96.
67. Unwin RD, Craven R a., Harnden P, Hanrahan S, Totty N, Knowles M, et al. Proteomic changes in renal cancer and co-ordinate demonstration of both the glycolytic and mitochondrial aspects of the Warburg effect. *Proteomics.* 2003;3(8):1620–32.
68. Wood SL, Rogers M, Cairns D a, Paul A, Thompson D, Vasudev NS, et al. Association of serum amyloid A protein and peptide fragments with prognosis in renal cancer. *Br J Cancer. Nature Publishing Group;* 2010;103(1):101–11.
69. Arsanious A, Bjarnason G a, Yousef GM. From bench to bedside: current and future applications of molecular profiling in renal cell carcinoma. *Mol Cancer.* 2009;8:20.
70. Youssef YM, White NM a, Grigull J, Krizova A, Samy C, Mejia-Guerrero S, et al. Accurate molecular classification of kidney cancer subtypes using MicroRNA signature. *Eur Urol.* 2011;59(5):721–30.

71. Perroud B, Lee J, Valkova N, Dhirapong A, Lin P-Y, Fiehn O, et al. Pathway analysis of kidney cancer using proteomics and metabolic profiling. *Mol Cancer*. 2006;5:64.
72. Cifola I, Spinelli R, Beltrame L, Peano C, Fasoli E, Ferrero S, et al. Genome-wide screening of copy number alterations and LOH events in renal cell carcinomas and integration with gene expression profile. *Mol Cancer*. 2008;7:6.
73. Finley DS, Pantuck AJ, Belldegrün AS. Tumor biology and prognostic factors in renal cell carcinoma. *Oncologist*. 2011;16 Suppl 2(suppl 2):4–13.
74. Yoshimoto T, Matsuura K, Karnan S, Tagawa H, Nakada C, Tanigawa M, et al. High-resolution analysis of DNA copy number alterations and gene expression in renal clear cell carcinoma. *J Pathol*. 2007 Dec;213(4):392–401.
75. Motzer RJ, Agarwal N, Beard C, Carducci MA, Choueiri TK, Jonasch E, et al. Kidney Cancer Clinical Practice Guidelines in Oncology. 2009;7(6):618–30.
76. Klatte T, Rao PN, De Martino M, Larochelle J, Shuch B, Zomorodian N, et al. Cytogenetic profile predicts prognosis of patients with clear cell renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2009;27(5):746–53.
77. Bui MHT, Seligson D, Han K, Pantuck AJ, Dorey FJ, Huang Y, et al. Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy. *Clin cancer Res*. 2003;9(2):802–11.
78. Kim HL, Seligson D, Liu X, Janzen N, Bui MHT, Yu H, et al. Using protein expressions to predict survival in clear cell renal carcinoma. *Clin cancer Res*. 2004;10(16):5464–71.
79. Brannon AR, Reddy A, Seiler M, Arreola A, Moore DT, Pruthi RS, et al. Molecular Stratification of Clear Cell Renal Cell Carcinoma by Consensus Clustering Reveals Distinct Subtypes and Survival Patterns. *Genes Cancer*. 2010;1(2):152–63.
80. Moch H, Schraml P, Bubendorf L, Mirlacher M, Kononen J, Gasser T, et al. High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am J Pathol*. 1999;154(4):981–6.
81. Boer JM, Huber WK, Sültmann H, Wilmer F, Heydebreck A Von, Haas S, et al. Identification and Classification of Differentially Expressed Genes in Renal Cell Carcinoma by Expression Profiling on a Global Human 31 , 500-Element cDNA Array. *Genome Res*. 2001;11:1861–70.
82. Kim HL, Seligson D, Liu X, Janzen N, Bui MHT, Yu H, et al. Using tumor markers to predict the survival of patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Urol*. 2005;173(5):1496–501.
83. Upton MP, Parker RA, Youmans A, McDermott DF, Atkins MB. Histologic predictors of renal cell carcinoma response to interleukin-2-based therapy. *J Immunother*. 2005 Jan;28(5):488–95.
84. Atkins M, Regan M, McDermott D, Mier J, Stanbridge E, Youmans A, et al. Carbonic anhydrase IX expression predicts outcome of interleukin 2 therapy for renal cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11(10):3714–21.
85. Rathmell WK, Godley PA. Recent updates in renal cell carcinoma. *Curr Opin Oncol*. 2010 May;22(3):250–6.
86. Choueiri TK. VEGF inhibitors in metastatic renal cell carcinoma: current therapies and future perspective. *Curr Clin Pharmacol*. 2011 Aug;6(3):164–8.
87. Minguet J, Smith KH, Bramlage CP, Bramlage P. Targeted therapies for treatment of renal cell carcinoma: recent advances and future perspectives. *Cancer Chemother Pharmacol*. Springer Berlin Heidelberg; 2015;76(2):219–33.
88. Kim JJ, Vaziri S a J, Rini BI, Elson P, Garcia J a., Wirka R, et al. Association of VEGF and VEGFR2 single nucleotide polymorphisms with hypertension and clinical outcome in metastatic clear cell renal cell carcinoma patients treated with sunitinib. *Cancer*. 2012;118(7):1946–54.
89. Hamnvik O-PR, Choueiri TK, Turchin A, McKay RR, Goyal L, Davis M, et al. Clinical risk factors for the development of hypertension in patients treated with inhibitors of the VEGF signaling pathway. *Cancer*. 2015;121(2):311–9.
90. Ganti S, Weiss RH. Urine metabolomics for kidney cancer detection and biomarker discovery. *Urol Oncol*. 2011 Jan;29(5):551–7.
91. Ganti S, Taylor SL, Kim K, Hoppel CL, Guo L, Yang J, et al. Urinary acylcarnitines are altered in human kidney cancer. *Int J Cancer*. 2012 Jun 15;130(12):2791–800.
92. Kim K, Aronov P, Zakharkin SO, Anderson D, Perroud B, Thompson IM, et al. Urine metabolomics analysis for kidney cancer detection and biomarker discovery. *Mol Cell Proteomics*. 2009 Mar;8(3):558–70.
93. Kim K, Taylor SL, Ganti S, Guo L, Osier M V., Weiss RH. Urine Metabolomic Analysis Identifies Potential Biomarkers and Pathogenic Pathways in Kidney Cancer. *Omi A J Integr Biol*. 2011 May;15(5):293–303.

94. Kind T, Tolstikov V, Fiehn O, Weiss RH. A comprehensive urinary metabolomic approach for identifying kidney cancer. *Anal Biochem.* 2007 Apr 15;363(2):185–95.
95. Ganti S, Taylor SL, Abu Aboud O, Yang J, Evans C, Osier M V, et al. Kidney tumor biomarkers revealed by simultaneous multiple matrix metabolomics analysis. *Cancer Res.* 2012 Jul 15;72(14):3471–9.
96. Lin L, Huang Z, Gao Y, Yan X, Xing J, Hang W. LC-MS based serum metabonomic analysis for renal cell carcinoma diagnosis, staging, and biomarker discovery. *J Proteome Res.* 2011 Mar 4;10(3):1396–405.
97. Joost HG, Thorens B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol.* 2001 Jan;18(4):247–56.
98. Joost H-G, Bell GI, Best JD, Birnbaum MJ, Charron MJ, Chen YT, et al. Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002 Apr;282(4):E974–6.
99. Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris HR, et al. Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science.* 1985 Sep 6;229(4717):941–5.
100. Burant CF, Bell GI. Mammalian facilitative glucose transporters: evidence for similar substrate recognition sites in functionally monomeric proteins. *Biochemistry.* 1992 Oct 27;31(42):10414–20.
101. Rea S, James DE. Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles. *Diabetes.* 1997 Dec;46(11):1667–77.
102. Gould GW, Thomas HM, Jess TJ, Bell GI. Expression of human glucose transporters in *Xenopus* oocytes: kinetic characterization and substrate specificities of the erythrocyte, liver, and brain isoforms. *Biochemistry.* 1991 May 28;30(21):5139–45.
103. Burant CF, Takeda J, Brot-Laroche E, Bell GI, Davidson NO. Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5. *J Biol Chem.* 1992 Jul 25;267(21):14523–6.
104. Colville CA, Seatter MJ, Jess TJ, Gould GW, Thomas HM. Kinetic analysis of the liver-type (GLUT2) and brain-type (GLUT3) glucose transporters in *Xenopus* oocytes: substrate specificities and effects of transport inhibitors. *Biochem J.* 1993 Mar 15;290 ( Pt 3):701–6.
105. Kayano T, Fukumoto H, Eddy RL, Fan YS, Byers MG, Shows TB, et al. Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins. Sequence and gene localization of a protein expressed in fetal skeletal muscle and other tissues. *J Biol Chem.* 1988 Oct 25;263(30):15245–8.
106. Doege H, Bocianski A, Joost HG, Schürmann A. Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes. *Biochem J.* 2000 Sep 15;350 Pt 3:771–6.
107. Doege H, Schürmann A, Bahrenberg G, Brauers A, Joost HG. GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity. *J Biol Chem.* 2000 May 26;275(21):16275–80.
108. Dawson PA, Mychaleckyj JC, Fossey SC, Mihic SJ, Craddock AL, Bowden DW. Sequence and functional analysis of GLUT10: a glucose transporter in the Type 2 diabetes-linked region of chromosome 20q12-13.1. *Mol Genet Metab.* Jan;74(1-2):186–99.
109. Heilig C, Zaloga C, Lee M, Zhao X, Riser B, Brosius F, et al. Immunogold localization of high-affinity glucose transporter isoforms in normal rat kidney. *Lab Invest.* 1995 Nov;73(5):674–84.
110. Sugawara-Yokoo M, Suzuki T, Matsuzaki T, Naruse T, Takata K. Presence of fructose transporter GLUT5 in the S3 proximal tubules in the rat kidney. *Kidney Int.* 1999 Sep;56(3):1022–8.
111. Yamamoto T, Seino Y, Fukumoto H, Koh G, Yano H, Inagaki N, et al. Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990 Jul 16;170(1):223–30.
112. Nagase Y, Takata K, Moriyama N, Aso Y, Murakami T, Hirano H. Immunohistochemical localization of glucose transporters in human renal cell carcinoma. *J Urol.* 1995 Mar;153(3 Pt 1):798–801.
113. Haber RS, Rathan A, Weiser KR, Pritsker A, Itzkowitz SH, Bodian C, et al. GLUT1 glucose transporter expression in colorectal carcinoma: a marker for poor prognosis. *Cancer.* 1998 Jul 1;83(1):34–40.
114. Wang BY, Kalir T, Sabo E, Sherman DE, Cohen C, Burstein DE. Immunohistochemical staining of GLUT1 in benign, hyperplastic, and malignant endometrial epithelia. *Cancer.* 2000 Jun 15;88(12):2774–81.

115. Rudlowski C, Becker AJ, Schroder W, Rath W, Büttner R, Moser M. GLUT1 messenger RNA and protein induction relates to the malignant transformation of cervical cancer. *Am J Clin Pathol*. 2003 Nov;120(5):691–8.
116. Brown RS, Wahl RL. Overexpression of Glut-1 glucose transporter in human breast cancer. An immunohistochemical study. *Cancer*. 1993 Nov 15;72(10):2979–85.
117. Nishioka T, Oda Y, Seino Y, Yamamoto T, Inagaki N, Yano H, et al. Distribution of the glucose transporters in human brain tumors. *Cancer Res*. 1992 Jul 15;52(14):3972–9.
118. Ogawa J, Inoue H, Koide S. Glucose-transporter-type-I-gene amplification correlates with sialyl-Lewis-X synthesis and proliferation in lung cancer. *Int J Cancer*. 1997 Apr 22;74(2):189–92.
119. Baer SC, Casaubon L, Younes M. Expression of the human erythrocyte glucose transporter Glut1 in cutaneous neoplasia. *J Am Acad Dermatol*. 1997 Oct;37(4):575–7.
120. Cantuaria G, Fagotti A, Ferrandina G, Magalhaes A, Nadji M, Angioli R, et al. GLUT-1 expression in ovarian carcinoma: association with survival and response to chemotherapy. *Cancer*. 2001 Sep 1;92(5):1144–50.
121. Lidgren A, Bergh A, Grankvist K, Rasmuson T, Ljungberg B. Glucose transporter-1 expression in renal cell carcinoma and its correlation with hypoxia inducible factor-1 alpha. *BJU Int*. 2008 Feb;101(4):480–4.
122. Ozcan A, Shen S, Zhai Q, Truong L. Expression of GLUT1 in Primary Renal Tumors: Morphologic and Biologic Implications. *Am J Clin Pathol*. 2007;128(2):245–54.
123. Miyakita H, Tokunaga M, Onda H, Usui Y, Kinoshita H, Kawamura N, et al. Significance of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) for detection of renal cell carcinoma and immunohistochemical glucose transporter 1 (GLUT-1) expression in the cancer. *Int J Urol*. 2002 Jan;9(1):15–8.
124. Fenske W, Volker H-U, Adam P, Hahner S, Johanssen S, Wortmann S, et al. Glucose transporter GLUT1 expression is an stage-independent predictor of clinical outcome in adrenocortical carcinoma. *Endocr Relat Cancer*. 2009;16(3):919–28.
125. Ayala FRR, Rocha RM, Carvalho KC, Carvalho AL, da Cunha IW, Lourenço SV, et al. GLUT1 and GLUT3 as potential prognostic markers for Oral Squamous Cell Carcinoma. *Molecules*. 2010 Apr;15(4):2374–87.
126. Kang SS, Chun YK, Hur MH, Lee HK, Kim YJ, Hong SR, et al. Clinical Significance of Glucose Transporter 1 (GLUT1) Expression in Human Breast Carcinoma. *Japanese J Cancer Res*. 2002 Oct 22;93(10):1123–8.
127. Ozerlat I. Kidney cancer: Targeted therapy of glucose uptake via GLUT1 kills RCC cells. *Nat Rev Urol*. Nature Publishing Group; 2011;8(9):471.
128. Supuran CT, Simone G De. Carbonic Anhydrases as Biocatalysts From Theory to Medical and Industrial Applications. *ScienceDirect*. 2015.
129. Alterio V, Di Fiore A, D'Ambrosio K, Supuran CT, De Simone G. Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms? *Chem Rev*. 2012 Aug 8;112(8):4421–68.
130. Mikulski RL, Silverman DN. Proton transfer in catalysis and the role of proton shuttles in carbonic anhydrase. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*. 2010 Feb;1804(2):422–6.
131. Silverman DN, McKenna R. Solvent-mediated proton transfer in catalysis by carbonic anhydrase. *Acc Chem Res*. 2007 Aug;40(8):669–75.
132. Boone CD, Pinard M, McKenna R, Silverman D. Catalytic mechanism of  $\alpha$ -class carbonic anhydrases: CO<sub>2</sub> hydration and proton transfer. *Subcell Biochem*. 2014 Jan;75:31–52.
133. Tu CK, Silverman DN, Forsman C, Jonsson BH, Lindskog S. Role of histidine 64 in the catalytic mechanism of human carbonic anhydrase II studied with a site-specific mutant. *Biochemistry*. 1989 Sep 19;28(19):7913–8.
134. Supuran CT. Carbonic anhydrases—an overview. *Curr Pharm Des*. 2008 Jan;14(7):603–14.
135. Lönnerholm G, Ridderstråle Y. Intracellular distribution of carbonic anhydrase in the rat kidney. *Kidney Int*. 1980 Feb;17(2):162–74.
136. Wistrand PJ, Knuutila KG. Renal membrane-bound carbonic anhydrase. Purification and properties. *Kidney Int*. 1989 Mar;35(3):851–9.
137. McKinley DN, Whitney PL. Particulate carbonic anhydrase in homogenates of human kidney. *Biochim Biophys Acta*. 1976 Oct 11;445(3):780–90.

138. Schwartz GJ, Kittelberger AM, Watkins RH, O'Reilly MA. Carbonic anhydrase XII mRNA encodes a hydratase that is differentially expressed along the rabbit nephron. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2003 Feb 1;284(2):F399–410.
139. Türeci O, Sahin U, Vollmar E, Siemer S, Göttert E, Seitz G, et al. Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cell cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jun 23;95(13):7608–13.
140. Ivanov S, Liao S-Y, Ivanova A, Danilkovitch-Miagkova A, Tarasova N, Weirich G, et al. Expression of Hypoxia-Inducible Cell-Surface Transmembrane Carbonic Anhydrases in Human Cancer. *Am J Pathol*. 2001 Mar;158(3):905–19.
141. Pastoreková S, Parkkila S, Parkkila AK, Opavský R, Zelník V, Saarnio J, et al. Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts. *Gastroenterology*. 1997 Feb;112(2):398–408.
142. Saarnio J, Parkkila S, Parkkila AK, Waheed A, Casey MC, Zhou XY, et al. Immunohistochemistry of carbonic anhydrase isozyme IX (MN/CA IX) in human gut reveals polarized expression in the epithelial cells with the highest proliferative capacity. *J Histochem Cytochem*. 1998 Apr;46(4):497–504.
143. Parkkila S, Rajaniemi H, Parkkila AK, Kivela J, Waheed A, Pastorekova S, et al. Carbonic anhydrase inhibitor suppresses invasion of renal cancer cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Feb 29;97(5):2220–4.
144. Robertson N, Potter C, Harris AL. Role of carbonic anhydrase IX in human tumor cell growth, survival, and invasion. *Cancer Res*. 2004 Sep 1;64(17):6160–5.
145. Svastová E, Zilka N, Zaťovicová M, Gibadulinová A, Ciampor F, Pastorek J, et al. Carbonic anhydrase IX reduces E-cadherin-mediated adhesion of MDCK cells via interaction with beta-catenin. *Exp Cell Res*. 2003 Nov 1;290(2):332–45.
146. Lou Y, McDonald PC, Oloumi A, Chia S, Ostlund C, Ahmadi A, et al. Targeting tumor hypoxia: suppression of breast tumor growth and metastasis by novel carbonic anhydrase IX inhibitors. *Cancer Res*. 2011 May 1;71(9):3364–76.
147. Chiche J, Ilc K, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Membrane-bound carbonic anhydrases are key pH regulators controlling tumor growth and cell migration. *Adv Enzyme Regul*. 2010 Jan;50(1):20–33.
148. Li Y, Tu C, Wang H, Silverman DN, Frost SC. Catalysis and pH control by membrane-associated carbonic anhydrase IX in MDA-MB-231 breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2011 May 6;286(18):15789–96.
149. Švastová E, Hulíková A, Rafajová M, Zaťovičová M, Gibadulinová A, Casini A, et al. Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Lett*. 2004 Nov 19;577(3):439–45.
150. Swietach P, Hulikova A, Vaughan-Jones RD, Harris AL. New insights into the physiological role of carbonic anhydrase IX in tumour pH regulation. *Oncogene*. 2010 Dec 16;29(50):6509–21.
151. Swietach P, Hulikova A, Vaughan-Jones RD, Harris a L. New insights into the physiological role of carbonic anhydrase IX in tumour pH regulation. *Oncogene*. Nature Publishing Group; 2010;29(50):6509–21.
152. Kaluz S, Kaluzová M, Liao SY, Lerman M, Stanbridge EJ. Transcriptional control of the tumor- and hypoxia-marker carbonic anhydrase 9: A one transcription factor (HIF-1) show? *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. Elsevier B.V.; 2009;1795(2):162–72.
153. Ditte P, Dequiedt F, Svastova E, Hulikova A, Ohradanova-Repic A, Zatovicova M, et al. Phosphorylation of carbonic anhydrase IX controls its ability to mediate extracellular acidification in hypoxic tumors. *Cancer Res*. 2011;71(24):7558–67.
154. Opavský R, Pastoreková S, Zelník V, Gibadulinová A, Stanbridge EJ, Závada J, et al. Human MN/CA9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: structure and exon to protein domain relationships. *Genomics*. 1996 May 1;33(3):480–7.
155. Tu C, Foster L, Alvarado A, McKenna R, Silverman DN, Frost SC. Role of zinc in catalytic activity of carbonic anhydrase IX. *Arch Biochem Biophys*. 2012;521(1-2):90–4.
156. Alterio V, Hilvo M, Di Fiore A, Supuran CT, Pan P, Parkkila S, et al. Crystal structure of the catalytic domain of the tumor-associated human carbonic anhydrase IX. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(38):16233–8.
157. Carney WP. Circulating oncoproteins HER2/neu, EGFR and CAIX (MN) as novel cancer biomarkers. *Expert Rev Mol Diagn*. 2007;7(3):309–19.
158. Kock L, Mahner S, Choschzick M, Eulenburg C, Milde-Langosch K, Schwarz J, et al. Serum carbonic anhydrase IX and its prognostic relevance in vulvar cancer. *Int J Gynecol cancer*. 2011 Jan;21(1):141–8.

159. Patard J-J, Fergelot P, Karakiewicz PI, Klatte T, Trinh Q-D, Rioux-Leclercq N, et al. Low CAIX expression and absence of VHL gene mutation are associated with tumor aggressiveness and poor survival of clear cell renal cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2008 Jul 15;123(2):395–400.
160. Sandlund J, Oosterwijk E, Grankvist K, Oosterwijk-Wakka J, Ljungberg B, Rasmuson T. Prognostic impact of carbonic anhydrase IX expression in human renal cell carcinoma. *BJU Int*. 2007;100(3):556–60.
161. Itoh N, Ornitz DM. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *J Biochem*. 2011 Feb;149(2):121–30.
162. Long YC, Kharitonov A. Hormone-like fibroblast growth factors and metabolic regulation. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Jul;1812(7):791–5.
163. Itoh N, Ornitz DM. Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family. *Dev Dyn*. 2008 Jan;237(1):18–27.
164. Harmer NJ, Pellegrini L, Chirgadze D, Fernandez-Recio J, Blundell TL. The crystal structure of fibroblast growth factor (FGF) 19 reveals novel features of the FGF family and offers a structural basis for its unusual receptor affinity. *Biochemistry*. 2004 Jan 27;43(3):629–40.
165. Kurosu H, Kuro-o M. The Klotho gene family as a regulator of endocrine fibroblast growth factors. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;299(1):72–8.
166. Kharitonov A, Shanafelt AB. FGF21: a novel prospect for the treatment of metabolic diseases. *Curr Opin Investig Drugs*. 2009;10(4):359–64.
167. Inagaki T, Dutchak P, Zhao G, Ding X, Gautron L, Parameswara V, et al. Endocrine Regulation of the Fasting Response by PPAR $\alpha$ -Mediated Induction of Fibroblast Growth Factor 21. *Cell Metab*. 2007;5(6):415–25.
168. Iglesias P, Selgas R, Romero S, Díez JJ. Biological role, clinical significance, and therapeutic possibilities of the recently discovered metabolic hormone fibroblastic growth factor 21. *Eur J Endocrinol*. 2012;167(3):301–9.
169. Kharitonov A, Shyanova TL, Koester A, Ford AM, Micanovic R, Galbreath EJ, et al. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest*. 2005;115(6):1627–35.
170. Li K, Li L, Yang M, Liu H, Boden G, Yang G. The effects of fibroblast growth factor-21 knockdown and over-expression on its signaling pathway and glucose–lipid metabolism in vitro. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 Jan 2;348(1):21–6.
171. Ge X, Chen C, Hui X, Wang Y, Lam KSL, Xu A. Fibroblast Growth Factor 21 Induces Glucose Transporter-1 Expression through Activation of the Serum Response Factor/Ets-Like Protein-1 in Adipocytes. *J Biol Chem*. 2011 Aug 16;286(40):34533–41.
172. Yang C, Wang C, Ye M, Jin C, He W, Wang F, et al. Control of lipid metabolism by adipocyte FGFR1-mediated adipohepatic communication during hepatic stress. *Nutr Metab (Lond). Nutrition & Metabolism*; 2012;9(1):94.
173. Foltz IN, Hu S, King C, Wu X, Yang C, Wang W, et al. Treating diabetes and obesity with an FGF21-mimetic antibody activating the  $\beta$ Klotho/FGFR1c receptor complex. *Sci Transl Med*. 2012;4(162):162ra153.
174. Luo Y, Yang C, Ye M, Jin C, Abbruzzese JL, Lee M-H, et al. Deficiency of metabolic regulator FGFR4 delays breast cancer progression through systemic and microenvironmental metabolic alterations. *Cancer Metab*. 2013;1(1):21.
175. Yang C, Lu W, Lin T, You P, Ye M, Huang Y, et al. Activation of Liver FGF21 in hepatocarcinogenesis and during hepatic stress. *BMC Gastroenterol*. 2013;13:67.
176. Hindricks J, Ebert T, Bachmann A, Kralisch S, Lössner U, Kratzsch J, et al. Serum levels of fibroblast growth factor-21 are increased in chronic and acute renal dysfunction. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2014;80(6):918–24.
177. Lin Z, Wu Z, Yin X, Liu Y, Yan X, Lin S, et al. Serum levels of FGF-21 are increased in coronary heart disease patients and are independently associated with adverse lipid profile. *PLoS One*. 2010;5(12):4–9.
178. Chavez AO, Molina-Carrion M, Abdul-Ghani M a., Folli F, DeFronzo R a., Tripathy D. Circulating fibroblast growth factor-21 is elevated in impaired glucose tolerance and type 2 diabetes and correlates with muscle and hepatic insulin resistance. *Diabetes Care*. 2009;32(8):1542–6.
179. Frye RA. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Jul 5;273(2):793–8.
180. Guarente L, Picard F. Calorie restriction--the SIR2 connection. *Cell*. 2005 Feb 25;120(4):473–82.
181. Imai S, Armstrong CM, Kaerberlein M, Guarente L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*. 2000 Feb 17;403(6771):795–800.

182. Planavila A, Iglesias R, Giral M, Villarroya F. Sirt1 acts in association with PPARalpha to protect the heart from hypertrophy, metabolic dysregulation, and inflammation. *Cardiovasc Res.* 2011;90(2):276–84.
183. Kim D, Nguyen MD, Dobbin MM, Fischer A, Sananbenesi F, Rodgers JT, et al. SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J.* 2007;26(13):3169–79.
184. Yuan Z, Zhang X, Sengupta N, Lane WS, Seto E. SIRT1 regulates the function of the Nijmegen breakage syndrome protein. *Mol Cell.* 2007 Jul 6;27(1):149–62.
185. Oberdoerffer P, Michan S, McVay M, Mostoslavsky R, Vann J, Park S-K, et al. SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell.* 2008 Nov 28;135(5):907–18.
186. North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E. The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD<sup>+</sup>-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell.* 2003 Feb;11(2):437–44.
187. Du J, Zhou Y, Su X, Yu JJ, Khan S, Jiang H, et al. Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase. *Science.* 2011 Nov 11;334(6057):806–9.
188. Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou DC, Murphy AJ, et al. SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell.* 2006 Sep 8;126(5):941–54.
189. Laurent G, German NJ, Saha AK, de Boer VCJ, Davies M, Koves TR, et al. SIRT4 Coordinates the Balance between Lipid Synthesis and Catabolism by Repressing Malonyl CoA Decarboxylase. *Mol Cell.* 2013 Jun 6;50(5):686–98.
190. Ford E, Voit R, Liszt G, Magin C, Grummt I, Guarente L. Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. *Genes Dev.* 2006 May 1;20(9):1075–80.
191. Tennen RI, Bua DJ, Wright WE, Chua KF. SIRT6 is required for maintenance of telomere position effect in human cells. *Nat Commun.* 2011 Jan;2:433.
192. Toiber D, Erdel F, Bouazoune K, Silberman D, Zhong L, Mulligan P, et al. SIRT6 recruits SNF2H to DNA break sites, preventing genomic instability through chromatin remodeling. *Mol Cell.* 2013;51(4):454–68.
193. McCord RA, Michishita E, Hong T, Berber E, Boxer LD, Kusumoto R, et al. SIRT6 stabilizes DNA-dependent protein kinase at chromatin for DNA double-strand break repair. *Aging (Albany NY).* 2009 Jan;1(1):109–21.
194. Kawahara TLA, Michishita E, Adler AS, Damian M, Berber E, Lin M, et al. SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span. *Cell.* 2009 Jan 9;136(1):62–74.
195. Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, Pang WW, Fischer MR, Gellon L, et al. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell.* 2006 Jan 27;124(2):315–29.
196. Zhong L, D'Urso A, Toiber D, Sebastian C, Henry RE, Vadysirisack DD, et al. The Histone Deacetylase Sirt6 Regulates Glucose Homeostasis via Hif1 $\alpha$ . *Cell.* Elsevier Ltd; 2010;140(2):280–93.
197. Zhong L, Mostoslavsky R. SIRT6: A master epigenetic gatekeeper of glucose metabolism. *Transcription.* 2010;1(1):17–21.
198. Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, et al. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Nov 12;93(23):12969–73.
199. Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, et al. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *EMBO J.* 1998 Nov 16;17(22):6573–86.
200. Sebastián C, Zwaans BMM, Silberman DM, Gymrek M, Goren A, Zhong L, et al. The histone deacetylase SIRT6 Is a tumor suppressor that controls cancer metabolism. *Cell.* 2012;151(6):1185–99.
201. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 1982 Oct;6(7):655–63.
202. Smith CA, O'Maille G, Want EJ, Qin C, Trauger SA, Brandon TR, et al. METLIN: a metabolite mass spectral database. *Ther Drug Monit.* 2005 Dec;27(6):747–51.
203. Iliopoulos O, Levy a P, Jiang C, Kaelin WG, Goldberg M a. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(20):10595–9.
204. Ashton-Sager A, Paulino AFG, Afify AM. GLUT-1 is preferentially expressed in atypical endometrial hyperplasia and endometrial adenocarcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2006 Jun;14(2):187–92.

205. Kawamura T, Kusakabe T, Sugino T, Watanabe K, Fukuda T, Nashimoto A, et al. Expression of glucose transporter-1 in human gastric carcinoma: association with tumor aggressiveness, metastasis, and patient survival. *Cancer*. 2001 Aug 1;92(3):634–41.
206. Minardi D, Lucarini G, Santoni M, Mazzucchelli R, Burattini L, Conti A, et al. Survival in patients with clear cell renal cell carcinoma is predicted by HIF-1 $\alpha$  expression. *Anticancer Res*. 2015 Jan;35(1):433–8.
207. Rubio-Briones J, Calatrava A, Fernández-Serra A, Ramos Ruiz R, Iborra I, García-Casado Z, et al. Expresión inmunohistoquímica de la densidad microvascular y de la anhidrasa carbónica IX en carcinoma renal. Relación con el tipo histológico y con la progresión tumoral. *Actas Urológicas Españolas*. 2011;35(2):80–6.
208. Muriel López C, Esteban E, Berros JP, Pardo P, Astudillo A, Izquierdo M, et al. Prognostic factors in patients with advanced renal cell carcinoma. *Clin Genitourin Cancer*. Elsevier; 2012;10(4):262–70.
209. Leibovich BC, Sheinin Y, Lohse CM, Thompson RH, Cheville JC, Zavada J, et al. Carbonic anhydrase IX is not an independent predictor of outcome for patients with clear cell renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2007;25(30):4757–64.
210. Skapa P, Hyršl L, Zavada J, Soukup J, Zamecnik J. Carbonic Anhydrase IX Expression in Clear Cell Renal Cell Carcinomas Negatively Correlates With the Proportion of the Granular Cell Component. *J Clin Oncol*. 2008 Aug 1;26(22):3809–11.
211. Zhang BY, Thompson RH, Lohse CM, Dronca RS, Cheville JC, Kwon ED, et al. Carbonic anhydrase IX (CAIX) is not an independent predictor of outcome in patients with clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) after long-term follow-up. *BJU Int*. 2013 Jun;111(7):1046–53.
212. Swinson DEB, Jones JL, Richardson D, Wykoff C, Turley H, Pastorek J, et al. Carbonic Anhydrase IX Expression, a Novel Surrogate Marker of Tumor Hypoxia, Is Associated With a Poor Prognosis in Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2003 Feb 1;21(3):473–82.
213. Zhang Q, Yang B, Chen X, Xu J, Mei C, Mao Z. Renal Gene Expression Database (RGED): a relational database of gene expression profiles in kidney disease. *Database*. 2014;(0):1–6.
214. Cimino-Mathews A, Sharma R, Netto GJ. Diagnostic use of PAX8, CAIX, TTF-1, and TGB in metastatic renal cell carcinoma of the thyroid. *Am J Surg Pathol*. 2011 May;35(5):757–61.
215. Loncaster JA, Harris AL, Davidson SE, Logue JP, Hunter RD, Wykoff CC, et al. Carbonic anhydrase (CA IX) expression, a potential new intrinsic marker of hypoxia: correlations with tumor oxygen measurements and prognosis in locally advanced carcinoma of the cervix. *Cancer Res*. 2001 Sep 1;61(17):6394–9.
216. Chia SK, Wykoff CC, Watson PH, Han C, Leek RD, Pastorek J, et al. Prognostic significance of a novel hypoxia-regulated marker, carbonic anhydrase IX, in invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol*. 2001 Aug 15;19(16):3660–8.
217. Måseide K, Kandel RA, Bell RS, Catton CN, O'Sullivan B, Wunder JS, et al. Carbonic anhydrase IX as a marker for poor prognosis in soft tissue sarcoma. *Clin Cancer Res*. 2004 Jul 1;10(13):4464–71.
218. Pinheiro C, Sousa B, Albergaria A, Paredes J, Dufloth R, Vieira D, et al. GLUT1 and CAIX expression profiles in breast cancer correlate with adverse prognostic factors and MCT1 overexpression. *Histol Histopathol*. 2011 Oct;26(10):1279–86.
219. Hoskin PJ, Sibbain A, Daley FM, Wilson GD. GLUT1 and CAIX as intrinsic markers of hypoxia in bladder cancer: relationship with vascularity and proliferation as predictors of outcome of ARCON. *Br J Cancer*. 2003 Oct 6;89(7):1290–7.
220. Airley RE, Loncaster J, Raleigh JA, Harris AL, Davidson SE, Hunter RD, et al. GLUT-1 and CAIX as intrinsic markers of hypoxia in carcinoma of the cervix: relationship to pimonidazole binding. *Int J Cancer*. 2003 Mar 10;104(1):85–91.
221. Zhou GX, Ireland J, Rayman P, Finke J, Zhou M. Quantification of Carbonic Anhydrase IX Expression in Serum and Tissue of Renal Cell Carcinoma Patients Using Enzyme-linked Immunosorbent Assay: Prognostic and Diagnostic Potentials. *Urology*. Elsevier Inc.; 2010;75(2):257–61.
222. Li G, Feng G, Gentil-Perret A, Genin C, Tostain J. Serum Carbonic Anhydrase 9 Level is Associated With Postoperative Recurrence of Conventional Renal Cell Cancer. *J Urol*. 2008;180(August):510–4.
223. Cheng F, Wang X, Zhong D, Sun L, Wang Q, Liu C. [Significance of detection of serum carbonic anhydrase IX in the diagnosis of lung cancer]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*. 2015 Jan;18(1):29–33.
224. Závada J, Závadová Z, Zát'ovičová M, Hyršl L, Kawaciuk I. Soluble form of carbonic anhydrase IX (CA IX) in the serum and urine of renal carcinoma patients. *Br J Cancer*. 2003;89(6):1067–71.



225. Zatovicova M, Sedlakova O, Svastova E, Ohradanova A, Ciampor F, Arribas J, et al. Ectodomain shedding of the hypoxia-induced carbonic anhydrase IX is a metalloprotease-dependent process regulated by TACE/ADAM17. *Br J Cancer*. 2005 Nov 8;93(11):1267–76.
226. Raval RR, Lau KW, Tran MGB, Heidi M, Mandriota SJ, Li J, et al. Contrasting Properties of HIF-2 in von Hippel-Lindau-Associated Renal Cell Carcinoma Contrasting Properties of Hypoxia-Inducible Factor 1 ( HIF-1 ) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-Associated Renal Cell Carcinoma. *Mcb*. 2005;1(13):5675–86.
227. Gälman C, Lundåsen T, Kharitonov A, Bina H a., Eriksson M, Hafström I, et al. The Circulating Metabolic Regulator FGF21 Is Induced by Prolonged Fasting and PPAR $\alpha$  Activation in Man. *Cell Metab*. 2008;8(2):169–74.
228. Gallego-Escuredo JM, Gómez-Ambrosi J, Catalan V, Domingo P, Giral M, Frühbeck G, et al. Opposite alterations in FGF21 and FGF19 levels and disturbed expression of the receptor machinery for endocrine FGFs in obese patients. *Int J Obes (Lond)*. 2015;39:121–9.
229. Zhang X, Yeung DCY, Karpisek M, Stejskal D, Zhou Z, Liu F, et al. Serum FGF21 Levels Are Increased in Obesity and Are Independently Associated With the Metabolic Syndrome in Humans. *Diabetes*. 2008;57:1246–53.
230. Luo Y, McKeehan WL. Stressed liver and muscle call on adipocytes with FGF21. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4(DEC):1–6.
231. Stein S, Anette B, Ulrike L, Kratzsch J, Matthias B, Stumvoll M, et al. Serum Levels of the Adipokine FGF21 Depend on Renal Function. *Diabetes Care*. 2009;32:126–8.
232. Hayes DF, Zurawski VR, Kufe DW. Comparison of circulating CA15-3 and carcinoembryonic antigen levels in patients with breast cancer. *J Clin Oncol*. 1986 Oct;4(10):1542–50.
233. Feng S, Dakhova O, Creighton CJ, Ittmann M. Endocrine fibroblast growth factor FGF19 promotes prostate cancer progression. *Cancer Res*. 2013;73(8):2551–62.
234. Pai R, Dunlap D, Qing J, Mohtashemi I, Hotzel K, French DM. Inhibition of fibroblast growth factor 19 reduces tumor growth by modulating beta-catenin signaling. *Cancer Res*. 2008;68(13):5086–95.
235. Eklund L, Olsen BR. Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. *Exp Cell Res*. 2006 Mar 10;312(5):630–41.
236. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell*. 1996 Dec 27;87(7):1161–9.
237. Xu Y, Yu Q. Angiopoietin-1, unlike angiopoietin-2, is incorporated into the extracellular matrix via its linker peptide region. *J Biol Chem*. 2001 Sep 14;276(37):34990–8.
238. Jones N, Master Z, Jones J, Bouchard D, Gunji Y, Sasaki H, et al. Identification of Tek/Tie2 binding partners. Binding to a multifunctional docking site mediates cell survival and migration. *J Biol Chem*. 1999 Oct 22;274(43):30896–905.
239. Tadros A, Hughes DP, Dunmore BJ, Brindle NPJ. ABIN-2 protects endothelial cells from death and has a role in the antiapoptotic effect of angiopoietin-1. *Blood*. 2003 Dec 15;102(13):4407–9.
240. Park YS, Kim NH, Jo I. Hypoxia and vascular endothelial growth factor acutely up-regulate angiopoietin-1 and Tie2 mRNA in bovine retinal pericytes. *Microvasc Res*. 2003 Mar;65(2):125–31.
241. Nishishita T, Lin PC. Angiopoietin 1, PDGF-B, and TGF- $\beta$  gene regulation in endothelial cell and smooth muscle cell interaction. *J Cell Biochem*. 2004 Feb 15;91(3):584–93.
242. Kobayashi Y, Yamamoto K, Saido T, Kawasaki H, Oppenheim JJ, Matsushima K. Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jul;87(14):5548–52.
243. Kong J, Grando SA, Li YC. Regulation of IL-1 family cytokines IL-1alpha, IL-1 receptor antagonist, and IL-18 by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in primary keratinocytes. *J Immunol*. 2006 Mar 15;176(6):3780–7.
244. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*. 2009 Jan;27:519–50.
245. Bersudsky M, Luski L, Fishman D, White RM, Ziv-Sokolovskaya N, Dotan S, et al. Non-redundant properties of IL-1 and IL-1 during acute colon inflammation in mice. *Gut*. 2013 Jun 21;63(4):598–609.
246. Kawaguchi Y, Hara M, Wright TM. Endogenous IL-1alpha from systemic sclerosis fibroblasts induces IL-6 and PDGF-A. *J Clin Invest*. 1999 May;103(9):1253–60.
247. Kaplanski G, Farnier C, Kaplanski S, Porat R, Shapiro L, Bongrand P, et al. Interleukin-1 induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism. *Blood*. 1994 Dec 15;84(12):4242–8.

248. Conlon PJ, Grabstein KH, Alpert A, Prickett KS, Hopp TP, Gillis S. Localization of human mononuclear cell interleukin 1. *J Immunol.* 1987 Jul 1;139(1):98–102.
249. Brody DT, Durum SK. Membrane IL-1: IL-1 alpha precursor binds to the plasma membrane via a lectin-like interaction. *J Immunol.* 1989 Aug 15;143(4):1183–7.
250. Kurt-Jones EA, Beller DI, Mizel SB, Unanue ER. Identification of a membrane-associated interleukin 1 in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Feb;82(4):1204–8.
251. Dvorkin T, Song X, Argov S, White RM, Zoller M, Segal S, et al. Immune phenomena involved in the in vivo regression of fibrosarcoma cells expressing cell-associated IL-1alpha. *J Leukoc Biol.* 2006 Jul;80(1):96–106.
252. Song X, Voronov E, Dvorkin T, Fima E, Cagnano E, Benharroch D, et al. Differential effects of IL-1 alpha and IL-1 beta on tumorigenicity patterns and invasiveness. *J Immunol.* 2003 Dec 15;171(12):6448–56.
253. Voronov E, Weinstein Y, Benharroch D, Cagnano E, Ofir R, Dobkin M, et al. Antitumor and immunotherapeutic effects of activated invasive T lymphoma cells that display short-term interleukin 1alpha expression. *Cancer Res.* 1999 Mar 1;59(5):1029–35.
254. Qin Y, Ekmekcioglu S, Liu P, Duncan LM, Lizée G, Poindexter N, et al. Constitutive aberrant endogenous interleukin-1 facilitates inflammation and growth in human melanoma. *Mol Cancer Res.* 2011 Nov;9(11):1537–50.
255. Tjomsland V, Spångaus A, Väilä J, Sandström P, Borch K, Druid H, et al. Interleukin 1α sustains the expression of inflammatory factors in human pancreatic cancer microenvironment by targeting cancer-associated fibroblasts. *Neoplasia.* 2011 Aug;13(8):664–75.
256. Carmi Y, Voronov E, Dotan S, Lahat N, Rahat MA, Fogel M, et al. The role of macrophage-derived IL-1 in induction and maintenance of angiogenesis. *J Immunol.* 2009 Oct 1;183(7):4705–14.
257. Voronov E, Shouval DS, Krelm Y, Cagnano E, Benharroch D, Iwakura Y, et al. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Mar 4;100(5):2645–50.
258. Kerrigan JJ, Mansell JP, Sandy JR. Matrix turnover. *J Orthod.* 2000 Sep;27(3):227–33.
259. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2002 Mar;2(3):161–74.
260. Arakaki PA, Marques MR, Santos MCLG. MMP-1 polymorphism and its relationship to pathological processes. *J Biosci.* 2009 Jun;34(2):313–20.
261. Pardo A, Selman M. MMP-1: the elder of the family. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005 Feb;37(2):283–8.
262. Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 1997 Sep 3;89(17):1260–70.
263. Murray GI, Duncan ME, O'Neil P, Melvin WT, Fothergill JE. Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Nat Med.* 1996 Apr;2(4):461–2.
264. Petrella BL, Vincenti MP. Interleukin-1β mediates metalloproteinase-dependent renal cell carcinoma tumor cell invasion through the activation of CCAAT enhancer binding protein β. *Cancer Med.* 2012 Aug;1(1):17–27.
265. Newman PJ, Newman DK. Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Jun 1;23(6):953–64.
266. Newman PJ. Switched at birth: a new family for PECAM-1. *J Clin Invest.* 1999 Jan;103(1):5–9.
267. Newman PJ. The biology of PECAM-1. *J Clin Invest.* 1997 Dec 1;100(11 Suppl):S25–9.
268. Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med.* 1993 Aug 1;178(2):449–60.
269. Wang S, Dangerfield JP, Young RE, Nourshargh S. PECAM-1, alpha6 integrins and neutrophil elastase cooperate in mediating neutrophil transmigration. *J Cell Sci.* 2005 May 1;118(Pt 9):2067–76.
270. Schenkel AR, Chew TW, Muller WA. Platelet endothelial cell adhesion molecule deficiency or blockade significantly reduces leukocyte emigration in a majority of mouse strains. *J Immunol.* 2004 Nov 15;173(10):6403–8.
271. DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS, et al. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol.* 1997 Sep;151(3):671–7.

272. Cao G, O'Brien CD, Zhou Z, Sanders SM, Greenbaum JN, Makrigiannakis A, et al. Involvement of human PECAM-1 in angiogenesis and in vitro endothelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002 May;282(5):C1181–90.
273. Sarafian MH, Gaudin M, Lewis MR, Martin FP, Holmes E, Nicholson JK, et al. Objective set of criteria for optimization of sample preparation procedures for ultra-high throughput untargeted blood plasma lipid profiling by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Chem*. 2014;86(12):5766–74.
274. Zang X, Jones CM, Long TQ, Monge ME, Zhou M, Walker LD, et al. Feasibility of Detecting Prostate Cancer by Ultraperformance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Serum Metabolomics. *J Proteome Res*. 2014 Jul 3;13(7):3444–54.
275. Jones CM, Monge ME, Kim J, Matzuk MM, Fernández FM. Metabolomic serum profiling detects early-stage high-grade serous ovarian cancer in a mouse model. *J Proteome Res*. 2015;14(2):917–27.
276. Horiguchi A, Asano T, Asano T, Ito K, Sumitomo M, Hayakawa M. Fatty acid synthase over expression is an indicator of tumor aggressiveness and poor prognosis in renal cell carcinoma. *J Urol*. 2008;180(3):1137–40.
277. Lin L, Huang Z, Gao Y, Yan X, Xing J, Hang W. LC-MS based serum metabonomic analysis for renal cell carcinoma diagnosis, staging, and biomarker discovery. *J Proteome Res*. 2011;10(3):1396–405.
278. Krzeslak A, Wojcik-Krowiranda K, Forma E, Jozwiak P, Romanowicz H, Bienkiewicz A, et al. Expression of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in endometrial and breast cancers. *Pathol Oncol Res*. 2012 Jul;18(3):721–8.
279. Younes M, Lechago L V, Somoano JR, Mosharaf M, Lechago J. Immunohistochemical detection of Glut3 in human tumors and normal tissues. *Anticancer Res*. 1997 Jan;17(4A):2747–50.
280. Hu C, Wang L, Chodosh L a, Keith B, Simon MC. Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha ( HIF-1 alpha ) and HIF-2 alpha in Hypoxic Gene Regulation. *Mol Cell Biol*. 2003;23(24):9361–74.
281. Carroll VA, Ashcroft M. Role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha versus HIF-2alpha in the regulation of HIF target genes in response to hypoxia, insulin-like growth factor-I, or loss of von Hippel-Lindau function: implications for targeting the HIF pathway. *Cancer Res*. 2006 Jun 15;66(12):6264–70.
282. Shinojima T, Oya M, Takayanagi A, Mizuno R, Shimizu N, Murai M. Renal cancer cells lacking hypoxia inducible factor (HIF)-1alpha expression maintain vascular endothelial growth factor expression through HIF-2alpha. *Carcinogenesis*. 2007;28(3):529–36.

